

Silvani Verruck

**PROPRIEDADES DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL
PROBIÓTICO DO LEITE DE BÚFALA (*Bubalus bubalis*)
E O SEU EMPREGO COMO MATRIZ PROTETORA DE
Bifidobacterium BB-12**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Ciência dos
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de mestre em Ciência dos
Alimentos.

Orientador: Prof^º. Dr^a. Elane
Schwinden Prudêncio

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Verruck, Silvani
PROPIEDADES DE QUEIJO TIPO MINAS FRESVAL PROBIÓTICO DO
LEITE DE BÚFALA (Bubalus bubalis) E O SEU EMPREGO COMO
MATRIZ PROTETORA DE Bifidobacterium BB-12 / Silvani
Verruck ; orientadora, Elane Schwinden Prudêncio -
Florianópolis, SC, 2014.
123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Queijo tipo Minas Frescal
de leite de búfala. 3. leite de búfala. 4. probióticos. 5.
reologia de alimentos. I. Schwinden Prudêncio, Elane. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Silvani Verruck

**PROPRIEDADES DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL
PROBIÓTICO DO LEITE DE BÚFALA (*Bubalus bubalis*) E O
SEU EMPREGO COMO MATRIZ PROTETORA DE
Bifidobacterium BB-12**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de agosto de 2014.

Prof.^a Roseane Fett, Dr.^a.
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof.^a Elane Schwinden Prudêncio, Dr.^a.
Orientadora - UFSC

Prof.^a Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.^a
UFSC

Prof.^a Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, Dr.^a
UFSC

Prof.^a Carmen Olivera Müller, Dr.^a
UFSC

*Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo o apoio e incentivo e ao Joel
por estar ao meu lado em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e por me dar mais esta oportunidade de aprendizado.

À minha família pelo constante apoio, ao Joel por estar sempre ao meu lado e em especial aos meus pais, Seni e Alcindo, por compreenderem a minha constante ausência neste período.

À minha orientadora Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pela orientação, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela dedicação e presença em todos os momentos deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, pelo incentivo e por todas as considerações dadas durante o trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Maria Olivera Müller, pela ajuda e ensinamentos na área de reologia dos alimentos.

À Profa. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira, pela colaboração com as análises de simulação gastrointestinal *in vitro*.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À todas as meninas do Laboratório de Leite e Derivados pela ajuda e companhia durante esse período.

À Profa. Dra. Sheila Mello da Silveira que me incentivou a realizar o mestrado.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas considerações.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A CAPES pela bolsa de estudo e ao CNPq pelo apoio financeiro através do projeto Universal (Processo nº 471942/2012-0).

À empresa Cryovac, pela doação das embalagens.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do cotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

RESUMO

Este trabalho visou elucidar o efeito da adição de *Bifidobacterium* BB-12 em um queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala. Para avaliar a influência da adição das bifidobactérias no queijo foram realizadas a contagem de células viáveis e análises físico-químicas, de sinérese, de cor, reológicas e microestruturais, por 30 dias de armazenamento. Para o estudo das propriedades reológicas foram avaliados os seguintes modelos: os mecânicos de Maxwell e Maxwell generalizado e o modelo empírico de Peleg. O queijo adicionado de bifidobactérias foi submetido às condições gastrintestinais simuladas *in vitro* (boca, esôfago-estômago, duodeno e íleo continuamente) a fim de determinar o efeito dessa matriz sobre a sobrevivência das bifidobactérias. A contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 no queijo foi de 8,15 log UFC/g no dia 1 e 8,36 log UFC/g no dia 30. A partir dos resultados obtidos, pôde-se observar que ao final de 30 dias de armazenamento os queijos contendo as bifidobactérias foram classificados como probióticos. As amostras de queijo controle e probiótico apresentaram aumento nos valores da sinérese de 2,58±0,09 g/100g no dia 1 para 4,66±0,01 g/100g no dia 30 e de 2,16±0,16 g/100g no dia 1 para 4,04±0,05 g/100g no dia 30, respectivamente. Os demais parâmetros físicos permaneceram inalterados. Os queijos mostraram tendência à cor branca ($L^*=89$). O modelo de Maxwell generalizado ($R^2>0,99$) ajustou-se melhor aos dados experimentais do que os modelos de Maxwell ($R^2<0,96$) e de Peleg ($R^2<0,95$). A adição de bifidobactérias e o tempo de armazenamento dos queijos tipo Minas Frescal do leite de búfala não afetaram as suas propriedades reológicas. Estas propriedades indicaram uma tendência à obtenção de queijos rígidos e elásticos, mostrando também tendência a ser mais elástico do que viscoso. Já, o efeito protetor do queijo de leite de búfala sobre as bifidobactérias foi observado durante as condições gastrointestinais simuladas, inclusive quanto à recuperação das células injuriadas após a etapa do duodeno (109,55±2,39%). Desta forma, o queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala apresentou efeito protetor para *Bifidobacterium* BB-12 durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, tornando-se assim um promissor carreador desta bactéria probiótica.

Palavras-chave: queijo tipo Minas Frescal; leite de búfala; probiótico; bifidobactéria; reologia; simulação gastrointestinal *in vitro*.

ABSTRACT

This study aimed to elucidate the effect of the *Bifidobacterium* BB-12 addition in a buffalo Minas Frescal cheese. To evaluate the influence of the addition of bifidobacteria in cheese the following analyzes were performed: Viability, physicochemical properties, syneresis, color, rheological and microstructural properties, for 30 days of storage. To study the rheological properties three mathematical models were tested for fit the relaxation data, the mechanical Maxwell model and Generalized Maxwell model and the empirical Peleg model. Subsequently, the cheese added with bifidobacteria was submitted to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (mouth, esophagus-stomach, duodenum and ileum, continuously) to evaluate the effect of this matrix on the survival of the bacteria. The count of viable *Bifidobacterium* BB-12 cells in the cheese was equal to 8.15 log CFU/g on day 1 and 8.36 log CFU/g on the day 30. From the results obtained, we observed that at the end of the storage time the sample containing bifidobacteria was classified as probiotic. The control and probiotic cheese samples, showed an increase on the syneresis values from 2.58±0.09 g/100g on day 1 to 4.66±0.01 g/100g on day 30 and from 2.16±0.16 g/100g on day 1 to 4.04±0.05 g/100g on day 30, respectively. The other physical parameters remained unchanged. The cheeses also showed a tendency to white color ($L^*=89$). The generalized Maxwell model ($R^2>0.99$) was adjusted to the experimental data better than the models of Maxwell ($R^2<0.96$) and Peleg ($R^2<0.95$). As expected, the addition of bifidobacteria and the storage time of Buffalo Minas Frescal cheese did not affect their rheological properties. These properties indicated a tendency to obtain stiff and elastic cheeses, showing a tendency to be more elastic than viscous. Already, the protective effect of the Buffalo Minas Frescal cheese on bifidobacteria was observed during simulated gastrointestinal conditions, including the recovery of injured cells after the duodenum step (109.55±2.39%). Thus, Buffalo Minas Frescal cheese appeared as a protector for *Bifidobacterium* BB-12 during the *in vitro* gastrointestinal simulation, making it a promising carrier for this probiotic bacterium.

Keywords: buffalo Minas Frescal cheese; buffalo milk; probiotic; bifidobacteria; rheology; *in vitro* simulated gastrointestinal conditions.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Micrografias do (A) leite de búfala e do (B) leite de vaca obtidas por microscopia óptica, demonstrando as diferenças relativas ao teor, à distribuição e ao tamanho dos glóbulos de gordura. | 30 |
| Figura 2 | Coordenadas tridimensionais utilizadas na medida instrumental da cor. | 36 |
| Figura 3 | Representação do diagrama instrumental da cor com localização do ângulo Hue (h^*) e Chroma (C^*). | 37 |
| Figura 4 | Curva típica do teste de relaxação. | 39 |
| Figura 5 | Curva típica dos estágios de deformação e relaxação obtida no teste de relaxação. | 39 |
| Figura 6 | Representação esquemática do modelo de Maxwell | 40 |
| Figura 7 | Representação esquemática do modelo de Maxwell generalizado | 41 |
| Figura 8 | Curva típica do teste de compressão uniaxial em amostras de queijo | 43 |

Capítulo 2

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figure 1 | Position of buffalo Minas Frescal cheeses in the CIE $L^*a^*b^*$ colorimetric system: (○) cheese without <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (control) and (●) cheese with <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (□) cheese without <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (control) and (■) cheese | 71 |
|-----------------|---|----|

with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage.

Figure 2 Compressive engineering stress (σ_E) vs. engineering strain (ϵ_E) for: (a) buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (b) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (c) buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (d) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage. 75

Figure 3 Typical experimental stress relaxation curves and values fitted with: (a) Maxwell model ($R^2 < 0.96$); (b) Generalized Maxwell model ($R^2 > 0.99$); and (c) Peleg model ($R^2 < 0.95$) for the buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic). 77

Figure 4 SEM micrographs of buffalo Minas Frescal cheese: (a) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (c) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (b) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (d) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage. 80

Capítulo 3

Figura 1 Contagem de células viáveis (média \pm desvio padrão) de *Bifidobacterium* BB-12, após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas para: (a) C2 - amostra de queijo não exposto às condições gastrointestinais simuladas (\square) e C3 - amostra de queijo exposto às condições gastrointestinais simuladas (\blacksquare); e (b) B2 - caldo MRS não exposto às condições gastrointestinais simuladas (\square) e B3 - caldo MRS exposto às condições gastrointestinais simuladas (\blacksquare). 100

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Constantes físico-químicas médias do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. | 27 |
| Tabela 2 | Composição média do leite de búfala em comparação aos leites de outras espécies | 28 |

Capítulo 2

| | | |
|----------------|---|----|
| Table 1 | Mean values \pm standard deviation of yield, physicochemical composition and color parameters (L^* , a^* , b^* , ΔE^* , C^* , h^*) of the buffalo Minas Frescal cheeses without <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (control) and cheeses with <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C. | 72 |
| Table 2 | Mean values \pm standard deviation of the compression parameters of the buffalo Minas Frescal cheeses without <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (control) and cheeses with <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C. | 74 |
| Table 3 | Mean values \pm standard deviation of the generalized Maxwell model stress-relaxation parameters for the buffalo Minas Frescal cheese without <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (control) and cheese with <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C. | 78 |

Capítulo 3

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Parâmetros usados em cada etapa das condições gastrointestinais simuladas. | 97 |
|-----------------|--|----|

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Tabela 2 | Taxa de sobrevivência (%) de Bifidobacterium BB-12 no queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala e no caldo MRS após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas. | 101 |
|-----------------|--|-----|

SUMÁRIO

| | |
|--|---------------|
| Introdução | 21 |
| Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica | 25 |
| 1 Revisão Bibliográfica | 27 |
| 1.1 Leite de búfala | 27 |
| 1.2 Probióticos | 31 |
| 1.3 O queijo tipo Minas Frescal e as suas propriedades microestruturais e de cor | 34 |
| 1.4 Análise reológica | 36 |
| Referências | 43 |
| Capítulo 2 – Propriedades reológicas de queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala adicionado de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em função do tempo de armazenamento | 59 |
| Resumo | 61 |
| Abstract | 61 |
| 1 Introduction | 62 |
| 2 Material and methods | 63 |
| 2.1 Material | 63 |
| 2.2 Manufacture of buffalo Minas Frescal cheeses | 64 |
| 2.3 Microbiological analysis | 64 |
| 2.4 Physicochemical analysis | 65 |
| 2.5 Syneresis | 65 |
| 2.6 Color analysis | 65 |
| 2.7 Rheological analysis | 66 |
| 2.7.1 Uniaxial compression | 66 |
| 2.7.2 Stress relaxation | 67 |
| 2.8 Microstructural analysis | 68 |
| 2.9 Statistical analysis | 69 |
| 3 Results and discussion | 69 |
| 3.1 Microbiological analysis | 69 |
| 3.2 Physicochemical analysis | 70 |
| 3.3 Color analysis | 70 |
| 3.4 Rheological analysis | 73 |
| 3.4.1 Uniaxial compression | 73 |

| | |
|--|---------------|
| 3.4.2 Stress relaxation | 76 |
| 3.5 Microstructural analysis | 80 |
| 4 Conclusions | 81 |
| Acknowledgements | 81 |
| References | 82 |
| Capítulo 3 – O queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala como matriz protetora de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i> | 89 |
| Resumo | 91 |
| Abstract | 91 |
| 1 Introdução | 92 |
| 2 Material e métodos | 94 |
| 2.1 Material | 94 |
| 2.2 Fabricação do queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala | 94 |
| 2.3 Sobrevivência das bifidobactérias em condições gastrointestinais simuladas | 95 |
| 2.3.1 Preparação das amostras de queijo | 95 |
| 2.3.2 Preparação do caldo MRS para ser usado como controle | 95 |
| 2.3.3 Condições gastrointestinais simuladas | 96 |
| 2.4 Análise microbiológica | 98 |
| 2.4.1 Taxa de sobrevivência das bifidobactérias | 98 |
| 2.5 Análise estatística | 99 |
| 3 Resultados e discussão | 99 |
| 4 Conclusões | 104 |
| Agradecimentos | 104 |
| Referências | 104 |
| Conclusões | 111 |
| Anexos | 113 |
| Anexo A – Artigo “Rheological behavior and protective effect of buffalo Minas Frescal cheese matrix on probiotic strain as a function of storage time” submetido à “Journal of Food Engineering” | 115 |
| Anexo B – Trabalhos apresentados em eventos | 119 |

INTRODUÇÃO

O leite de búfala (*Bubalus bubalis*) e seus derivados são considerados de alto valor nutricional, devido aos seus teores de sólidos totais, representados pela gordura, proteína e sais minerais (HAN et al., 2007; MÉNARD et al., 2010). No Brasil, a partir deste leite são produzidos tradicionalmente queijos como a muçarela e os frescais (BUZI et al., 2009), que apesar de requererem técnicas de produção específicas, geralmente apresentam maior rendimento do que o queijo de leite de vaca (GUERRA; NEVES; PENA, 2005; HUSSAIN et al., 2012). Teixeira, Bastianetto e Oliveira (2005) ressaltam que os produtos fabricados a partir do leite de búfala, em especial os queijos, são de ótima qualidade sensorial. Ménard et al. (2010) relatam que, com exceção da muçarela, os derivados do leite de búfala apresentam pouca significância no mercado consumidor. Buzi et al. (2009) afirmam que as poucas pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de novos produtos provenientes do leite de búfala, poderiam ser responsáveis por tal comportamento. No entanto, o queijo tipo Minas Frescal tem a sua importância no mercado brasileiro em decorrência do alto rendimento, baixo custo final, menor preço e simplicidade no processo de fabricação, tornando-o mais atraente para a indústria queijeira (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

Na indústria queijeira o desenvolvimento de alimentos com alegações funcionais já é uma realidade. Segundo Verbecke (2006), Urala e Lähteenmäki (2007) e Siró et al. (2008) tal fato é decorrente da preocupação dos consumidores com a saúde. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999), alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Ou seja, são considerados alimentos com alegações funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (CARRILLO et al., 2013; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013). Uma das prioridades das pesquisas em todo o mundo é elucidar as propriedades de alimentos com alegações funcionais (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011), neste sentido, derivados do leite de búfala com estas propriedades poderiam impulsionar este setor através do desenvolvimento de produtos inovadores, atendendo à atual exigência

dos consumidores (CARRILLO et al., 2013; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013). De acordo com Aureli et al. (2011) entre os alimentos com alegações funcionais estão aqueles adicionados de microrganismos probióticos.

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006), melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal e as defesas contra microrganismos patogênicos (SAAD et al., 2013). As espécies que mais são usadas como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (AKALIN et al., 2012). No entanto, é necessário que a contagem de células viáveis de bactérias probióticas sejam maiores do que 6 log Unidade Formadora de Colônia (UFC) por mL ou g do produto, a fim de exercer o efeito terapêutico desejado (CHEN; WALKER, 2005). Segundo Gomes e Malcata (1999), a necessidade de manter um número elevado de microrganismos viáveis no produto final é decorrente da dose diária mínima recomendada, usualmente considerada de 8 a 9 log UFC por 100 mL ou 100 g do produto.

Vários benefícios à saúde têm sido atribuídos às bactérias probióticas, como por exemplo, o equilíbrio da microbiota intestinal, os efeitos antimutagênicos, as propriedades anticarcinogênicas, a melhora no metabolismo da lactose, a redução no colesterol sérico e a estimulação do sistema imune (PANDE et al., 2012). Entretanto, cabe ressaltar que estes produtos devem ser consumidos regularmente para manter o efeito destes microrganismos na composição da microbiota intestinal. Os veículos existentes para carrear microrganismos probióticos integram três grandes grupos: os alimentos infantis, as preparações farmacêuticas e os produtos lácteos. Destes, o grupo mais representativo é o dos produtos lácteos, com destaque para os leites fermentados, iogurtes e queijos (FARIA; BENEDET; LE GUERROUE, 2006).

Apesar de estarem sendo incorporados em produtos lácteos, diversos fatores têm sido identificados como desfavoráveis à viabilidade das bactérias probióticas, como por exemplo, a acidez; a presença de oxigênio, especialmente para bifidobactérias; as interações entre espécies antagonistas; os métodos de inoculação; assim como as condições de estocagem. As bifidobactérias requerem um ambiente anaeróbio e pH neutro (6,5-7,0) para sobreviverem e se manterem em contagem adequada (BOYLSTON et al., 2004; RUSSEL et al., 2011). Processos têm sido realizados visando à produção de queijos com bactérias probióticas (BOYLSTON et al., 2004; FRITZEN-FREIRE et

al., 2010a). No entanto, os queijos, com pH variando entre 4,8 e 5,6, são capazes de proporcionar um meio mais estável para sobrevivência a longo prazo de bifidobactérias ácido-sensíveis (MARCATTI et al., 2009). Além disso, o metabolismo de microrganismos no interior dos queijos resulta em um ambiente quase anaeróbio favorecendo a sobrevivência das bifidobactérias. Por fim, a matriz do queijo e sua relativamente alta concentração de gordura oferecem também proteção para as bactérias probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Em síntese, os queijos, devido ao pH, conteúdo de lipídeos, presença de oxigênio e condições de estocagem oferecem condições mais favoráveis para a sobrevivência de bifidobactérias, tanto durante o processamento e estocagem, como durante o processo digestivo (BOYLSTON et al., 2004).

Dentre os queijos considerados adequados à adição de bifidobactérias têm-se o tipo Minas Frescal (FRITZEN-FREIRE et al., 2010a). Este queijo tipicamente brasileiro, apresenta alta atividade de água, pH acima de 5,0, baixo teor de sais e ausência de preservativos, oferecendo excelente condições para a sobrevivência de microrganismos probióticos (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005). Contudo, trabalhos realizados com queijos frescais empregando o leite de búfala são praticamente inexistentes. Marcatti et al. (2009) verificaram que o queijo tipo Minas frescal de leite de búfala seria um alimento adequado para incorporação de *Lactobacillus acidophilus*, uma vez que esta cultura permaneceu viável.

Boylston et al. (2004) afirmam que o sucesso da incorporação de bifidobactérias em queijos depende de fatores como as condições de processamento. Estes autores ainda destacam que um queijo adicionado de bifidobactéria poderia contribuir para o desenvolvimento de alimentos saudáveis com características aceitáveis. Entretanto, Settanni e Moschetti (2010) relatam que as características de queijos adicionados de probióticos devem ser similares aos tradicionais, ou seja, aqueles sem adição deste tipo de microrganismo. Desta forma, além do caráter inovador, a avaliação do efeito da adição de *Bifidobacterium* BB-12 nas propriedades de queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala se justificaria, pois será capaz de fornecer resultados científicos referentes ao protocolo de processamento e à sobrevivência destas bactérias em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Desta forma, este trabalho está apresentado nos seguintes capítulos:

(a) capítulo 1 referente à revisão bibliográfica, onde são abordados os principais temas estudados neste trabalho;

(b) capítulo 2, referente ao estudo das propriedades reológicas de queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala adicionado de *Bifidobacterium* BB-12, nos dias 1 e 30 de armazenamento em temperatura refrigeração (5 ± 1 °C); e

(c) capítulo 3, referente à avaliação do queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala como matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

Cabe ressaltar que os comprovantes de submissão em revista indexada do artigo (Anexos A) e os comprovantes dos trabalhos parciais publicados em eventos científicos da área de Ciência dos Alimentos (Anexo B) estão apresentados em anexo.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

1. Revisão bibliográfica

1.1 Leite de búfala (*Bubalus Bubalis*)

De acordo com a *International Dairy Federation* (2013) o leite de búfala (*Bubalus bubalis*) apresenta-se como o segundo tipo de leite mais consumido no mundo com uma produção anual de aproximadamente 97 milhões de toneladas, ficando atrás somente do leite de vaca. No Brasil, não há uma estimativa precisa de quantas toneladas deste tipo de leite são produzidas, porém o país apresenta um rebanho estimado de três milhões de cabeças (ABCB, 2013).

O leite de búfala vem se destacando por apresentar características físico-químicas (Tabela 1) e nutricionais melhores em comparação aos leites de outras espécies (Tabela 2). O leite de búfala contém maiores teores de proteína, gordura e lactose em comparação a leites de outras espécies (SHINDHU; ARORA, 2011) e, desta forma, de sólidos totais (PATEL; MISTRY, 1997). Devido a estas propriedades o seu rendimento na fabricação de derivados é também superior ao leite de outras espécies (VERRUMA; SALGADO, 1994). Entretanto, Amaral et al. (2005) ressaltam que a composição do leite búfala pode variar com fatores ambientais, como estação do ano, e com o estado nutricional do animal, além de fatores como raça, idade e estágio da lactação.

Tabela 1: Constantes físico-químicas médias do leite de búfala em comparação ao leite de vaca.

| Parâmetros | Búfala | Vaca |
|---|---------|---------|
| Densidade (g cm^{-3} , 15°C) | 1,033 | 1,032 |
| Viscosidade (mPa s^{-1} , 20°C) | 2,04 | 1,63 |
| Tensão superficial (Dinas cm^{-1}) | 55,4 | 55,9 |
| Acidez (°D) | 20 | 17 |
| pH | 6,70 | 6,60 |
| Índice crioscópico (°C) | - 0,534 | - 0,531 |
| Tamanho médio dos glóbulos de gordura (μm) | 5,01 | 3,85 |
| Número de glóbulos de gordura (milhões mm^{-3}) | 3,2 | 2,96 |

Fonte: Eckles, Willes e Harold (2001), González (2001) e Neto et al. (2005).

As proteínas do leite búfala são divididas em caseínas (75 - 80 %) e proteínas de soro (20 - 25 %) (CHAVES, 2011). As caseínas consistem principalmente das frações α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, enquanto as do soro são representadas pela β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactoalbumina (α -La) (SHINDHU; ARORA, 2011). O teor das frações α -, β - e κ -caseína no leite de búfala supera o teor apresentado pelo leite

de vaca. Essas frações proteicas têm como função transportar íons (Ca, PO_4 , Fe, Zn, Cu) e, serem precursores de peptídeos bioativos (SINGH; BENNETT, 2002).

Tabela 2: Composição média do leite de búfala em comparação aos leites de outras espécies

| Componentes | Vaca | Cabra | Ovelha | Búfala |
|-------------------------|------|-------|--------|--------|
| Proteína (g/100g) | 3,2 | 3,1 | 5,4 | 4,5 |
| Gordura (g/100g) | 3,9 | 3,5 | 6,0 | 8,0 |
| Carboidratos (g/100g) | 4,8 | 4,4 | 5,1 | 4,9 |
| Energia (Kcal/100g) | 66 | 60 | 95 | 110 |
| <i>Ácidos Graxos:</i> | | | | |
| Saturado (g/100g) | 2,4 | 2,3 | 3,8 | 4,2 |
| Monoinsaturado (g/100g) | 1,1 | 0,8 | 1,5 | 1,7 |
| Poliinsaturado (g/100g) | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| Colesterol (mg/100g) | 14 | 10 | 11 | 8 |

Fonte: Eckles, Willes e Harold (2001).

As caseínas do leite de búfala se apresentam em sua maioria na forma micelar, com tamanhos que variam de 110 a 150 μm de diâmetro, enquanto as do leite de vaca apresentam-se entre 70 e 110 μm de diâmetro (VERRUMA; SALGADO, 1994). As micelas de caseína são formadas por um complexo orgânico de α -, β - e κ -caseína ligadas ao fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) insolúvel. No leite, em pH 6,7, estas micelas estão carregadas negativamente, assim a repulsão eletrostática entre elas, além da presença de grupos glicídicos hidrófilos, asseguram a sua estabilidade (SINGH; BENNETT, 2002). O maior tamanho das micelas do leite de búfala, bem como o maior teor de cálcio e fósforo, faz com que a κ -caseína tenha menor capacidade de estabilizar a α -caseína no processo de coagulação. Por esse motivo, o leite de búfala é mais sensível ao agente coagulante, coagulando mais rapidamente do que o leite de vaca (GANGULI, 1992).

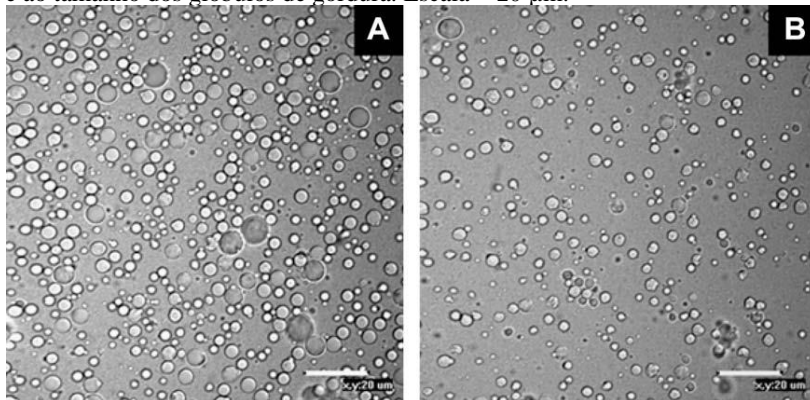
Assim como as proteínas, o teor de minerais do leite de búfala também é maior (ENB et al., 2009), com destaque para a relação Ca/P que é 1,71, enquanto que no leite de vaca é de 1,31 (DE FRANCISCIS; DI PALO, 1994). Em comparação com o leite de vaca, o leite de búfala é considerado rico em cátions divalentes, como cálcio e magnésio, porém com menores teores de sódio e potássio, que são cátions monovalentes, e em cloretos, ânions monovalentes. No entanto, o teor de ânions divalentes, fosfatos e citratos, são semelhantes nos dois leites (SHINDHU; ARORA, 2011).

Da mesma forma que os teores proteicos e de minerais, o alto teor de gordura do leite de búfala tem também incentivado o seu beneficiamento (MÉNARD et al., 2010). No entanto, são observadas diferenças no tamanho e distribuição dos glóbulos de gorduras entre as diferentes espécies produtoras de leite (EL-ZEINI, 2006). Comparando o leite de búfala com o de vaca, pode-se verificar (Figura 1) diferenças no tamanho e na distribuição dos glóbulos de gordura, bem como em algumas de suas propriedades físico-químicas. Ménard et al. (2010) observaram que o tamanho dos glóbulos de gordura variaram de 1,1 a 10 μm para o leite de vaca, enquanto para o de búfala ficou entre 0,4 a 15 μm . No entanto, estes autores verificaram que a média do tamanho dos glóbulos de gordura no leite de búfala foram maiores. Ménard et al. (2010) afirmaram que este comportamento pode ser creditado à membrana do glóbulo de gordura, que poderia ser um fator limitante na formação de pequenos glóbulos de gordura, em leites com altos teores de gordura, como o de búfala. El-Zeini (2006) relata que leites com altos teores de gordura como o de búfala, geralmente contém grandes glóbulos de gordura, o que seria característico desta espécie. El-Zeini (2006) obteve um baixo teor de glóbulos de gorduras de pequenos tamanhos (menor do que 4 μm) e maiores teores de grandes glóbulos (maior do que 8 μm) em leite de búfala, quando comparados a leites de outras espécies, como por exemplo, cabra, vaca e ovelha. Já Ménard et al. (2010) afirmam que o leite de búfala contém maiores teores de lipídeos polares do que o leite de vaca. Estes lipídeos polares são compostos bioativos, que definem as propriedades estruturais das membranas do glóbulo e lipoproteínas, o que tornaria o leite de búfala integral de grande valor nutritivo. Noh e Koo (2004) observaram que, particularmente, os esfingolipídeos do leite estão envolvidos na absorção intestinal de colesterol, enquanto Berra et al. (2002) ressaltam que estudos têm demonstrado o potencial anticarcinogênico de fosfolipídeos, especialmente o papel da esfingomielina contra o câncer de cólon.

Quanto à composição de ácidos graxos, o leite de búfala apresenta em sua composição aproximadamente 30 % de insaturados e 70 % de saturados. Tanto para o leite de búfala como o de vaca, o maior teor de ácidos graxos é representado pelo ácido palmítico (C16:0), seguido de oleico (C18:1 cis-9), mirístico (C14:0) e esteárico (C18:0) (MÉNARD et al., 2010). Também em comparação ao leite de vaca, Verruma e Salgado (1994) encontraram no de búfala, teores mais elevados de ácidos graxos insaturados de cadeia longa como o palmitoleico (C16:1) e linoleico (C18:2), além de menores teores de

miristoleico (C14:1) e oleico (C18:1).

Figura 1: Micrografias do (A) leite de búfala e do (B) leite de vaca obtidas por microscopia óptica, demonstrando as diferenças relativas ao teor, à distribuição e ao tamanho dos glóbulos de gordura. Escala = 20 μ m.



Fonte: Ménard et al. (2010).

Assim como Varrichio et al. (2007), Ménard et al. (2010) também obtiveram maiores teores de ácido linoleico conjugado (CLA) (C18:2 cis-9, trans-11) no leite de búfala quando comparado ao de vaca. Estes resultados são importantes porque incentivam o consumo de leite de búfala e seus derivados, uma vez que os isômeros de CLA apresentam propriedades anticarcinogênicas, principalmente quanto ao câncer de cólon; antiaterogênicas; antiobesidade e antidiabéticas (BAUMAN; PERFIELD; LOCK, 2004).

O leite de búfala não apresenta em sua composição pró vitamina A (β -caroteno), que confere à gordura do leite de vaca coloração amarelada. No leite de búfala e derivados, há apenas a vitamina A, que é incolor, desta maneira conferindo coloração branca a eles. Este leite contém também maiores teores de vitamina E (tocoferol), ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido *p*-aminobenzoico, ácido fólico e piridoxina (SHINDHU; ARORA, 2011).

Ménard et al. (2010) recomendam a obtenção de derivados lácteos do leite de búfala devido à composição deste tipo de leite. Vários são os derivados que podem ser produzidos a partir do leite de búfala, os mais comuns são iogurte, manteiga, leite condensado, sorvete e algumas variedades de queijos (VERRUMA; SALGADO; OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA; ALMEIDA; SOUZA, 1997). No entanto, o leite de búfala

não é considerado apropriado para a fabricação de certas variedades de queijos curados como cheddar, gouda e emmental. Essas variedades de queijos maturados feitos com leite de búfala não têm sabor agradável, além de apresentarem textura caracterizada como dura, emborrachada e seca. Esses problemas podem ocorrer devido ao desenvolvimento lento da acidez, menor retenção de água, e uma menor taxa de glicólise, proteólise e lipólise, em comparação aos queijos do leite de vaca (SHINDHU; ARORA, 2011). Por esses motivos o leite de búfala é mais recomendado para a fabricação de queijos não maturados, sendo os mais populares a muçarela e o tipo Minas Frescal (TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

1.2 Probióticos

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos, denominados funcionais e, de alguns de seus componentes, sobre a saúde do consumidor têm sido estudados (CARRILLO et al., 2013). O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação (OLIVEIRA et al., 2002). A legislação brasileira define como propriedade funcional aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais pode, além de funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999). Dentre os alimentos com alegações funcionais estão classificados aqueles adicionados de microrganismos probióticos (STANTON et al., 1998).

Probióticos são microrganismos vivos, que após a ingestão em determinada quantidade, de forma contínua, exercem benefícios à saúde do consumidor (STANTON et al., 1998; BRASIL, 2002; FAO/WHO, 2006; SALMINEN; KENIFEL; OUWEHAND, 2011). Em produtos lácteos as culturas mais empregadas são as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; BOYLSTON et al., 2004; SAAD et al., 2013), as quais têm sido isoladas de porções do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (GOMES; MALCATA, 1999; BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002).

Os microrganismos do gênero *Bifidobacterium* são bacilos

gram-positivos, não formadores de esporos; sem motilidade; catalase negativos; anaeróbios estritos; e algumas estirpes desenvolvem ramificações parecendo morfologicamente com “V”, “Y”, “X”, ou outras formas. No entanto, o seu polimorfismo depende principalmente do meio de cultura e das condições de crescimento (JIN BAEK; LEE, 2009; SHAH, 2011b). A maioria das espécies de *Bifidobacterium* de origem humana produz vitaminas tais como a tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cobalamina (B12), ácido ascórbico (C), ácido nicotínico (PP) e biotina (O’CONNOR et al., 2005; SHAH, 2011b).

Dentre os efeitos benéficos do consumo de probióticos, têm-se o equilíbrio da microbiota intestinal e melhora da digestibilidade (GOMES; MALCATA, 1999), do metabolismo da lactose, da resposta do sistema imunológico, das propriedades anticarcinogênicas (GOMES; MALCATA, 1999; SHAH, 2011a), da biodisponibilidade de nutrientes, da produção de compostos antimicrobianos (O’MAY; MACFARLANE, 2005; SHAH, 2011a), da motilidade, do alívio da constipação intestinal (O’MAY; MACFARLANE, 2005), bem como a diminuição de infecção por *Helicobacter pylori* no estômago (SHAH, 2011a). A inibição da colonização do intestino humano por microrganismos patogênicos potenciais ocorre através da competição por sítios de adesão e nutrientes e, eventualmente, a produção de peróxido de hidrogênio, além da acidificação do ambiente e da produção de outras substâncias antimicrobianas geradas pelos microrganismos probióticos (SAAD et al., 2013). Os probióticos pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, além de produzir peróxido de hidrogênio, produzem substâncias antimicrobianas, tais como ácidos orgânicos, como, por exemplo, ácido láctico e acético; além de bacteriocinas, que são capazes de suprimir a multiplicação de bactérias patogênicas e putrefativas no intestino (JIN BAEK; LEE, 2009; SHAH, 2011b). Todavia, para que as culturas probióticas exerçam efetivamente benefícios é preciso que a contagem de células viáveis no alimento pronto esteja entre 6-7 log Unidades Formadoras de Colônias (UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ do produto). A compensação de eventuais perdas durante o processamento e o armazenamento dos alimentos, bem como a perda durante a passagem pelo trato gastrointestinal podem influenciar diretamente nesta contagem (VASILJEVIC, 2008). Assim sendo, consumindo 100 g ou 100 mL de um produto contendo de 8-9 log UFC estará sendo consumida a dose diária recomendada para que se tenham os benefícios terapêuticos (GOMES; MALCATA, 1999; BOYLSTON et al., 2004; SHAH, 2011a). No entanto, para que exerçam esses efeitos terapêuticos no

hospedeiro além de estarem em contagem suficiente é preciso que os microrganismos, neste caso os probióticos, consigam ultrapassar intactos o sistema digestivo humano (SHAH, 2011b). Como os efeitos dos probióticos estão diretamente relacionados com a sua atividade no trato digestivo, e estes dependem de sua sobrevivência nesse ambiente, essas bactérias devem ser resistentes aos processos fisiológicos e físico-químicos do sistema gastrointestinal. Para Naidu et al. (1999), as bactérias probióticas devem sobreviver à passagem através da boca, do esôfago, do estômago (pH 2), e do intestino delgado para exercer seus benefícios no íleo. Desta forma, devem ser capazes de sobreviver ao suco gástrico (ácido clorídrico), suco pancreático e aos sais biliares, sobrevivendo em condições ácidas (estômago) e básicas (duodeno) (ORTAKCI et al., 2012).

Para avaliar a sobrevivência dos probióticos durante e após a ingestão, metodologias de simulação gastrointestinal *in vitro* estão sendo utilizadas como uma abordagem simples e rápida em substituição aos ensaios *in vivo*, uma vez que esses últimos são estudos caros de longo prazo e com alta variabilidade entre indivíduos (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Alguns estudos realizaram ensaios gastrointestinais *in vitro* e avaliaram a sobrevivência de probióticos em alimentos estruturados (semi-sólidos ou sólidos) (ORTAKCI et al., 2012; ABADÍA-GARCIA et al., 2013; SOLIERI et al., 2014; MÄKELÄINEN et al., 2009), porém não continuamente como ocorre naturalmente durante a digestão. Já Madureira et al. (2011) recomenda a utilização de um modelo gastrointestinal *in vitro* contínuo que inclua todos os compartimentos do trato gastrointestinal, simulação mecânica de movimentos peristálticos e também um gradiente de pH no estômago.

A escolha da matriz para carrear probióticos é considerada um elemento importante quando se trata de aplicação em alimentos, uma vez que a composição do alimento poderá afetar a sobrevivência no ambiente gastrointestinal (SANDERS; MARCO, 2010). Dentre os derivados lácteos existentes, o queijo pode oferecer certas vantagens sobre iogurtes e produtos fermentados, quanto à proteção dos microrganismos probióticos viáveis adicionados. O pH mais elevado, maior teor de gordura e consistência mais sólida do queijo podem oferecer maior proteção para os probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (STANTON et al., 1998). No entanto, para que as bifidobactérias possam ser adicionadas em produtos lácteos, como o queijo, é preciso observar alguns fatores importantes. Os probióticos devem permanecer vivos e em contagem adequada durante toda a

validade do produto e não devem produzir metabólitos prejudiciais à qualidade do queijo (TAMIME et al., 2005). Entretanto, levando em consideração que o leite de búfala não é considerado apropriado para a fabricação de queijos maturados, uma possibilidade seria o desenvolvimento do queijo tipo Minas Frescal (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

1.3 O queijo tipo Minas Frescal e as suas propriedades microestruturais e de cor

Entende-se por queijo tipo Minas Frescal aquele obtido por coagulação enzimática do leite, e pode ser adicionado de bactérias láticas específicas em seu processamento. Este queijo apresenta coloração branca, consistência macia, textura com eventuais olhaduras e sabor suave ou levemente ácido (BRASIL, 2004).

Buriti, Rocha e Saad (2005) relatam que o queijo tipo Minas Frescal apresenta características consideradas ideais para a sobrevivência de probióticos, como por exemplo, alta atividade de água, pH acima de 5,0, baixo teor de sal e ausência de conservantes (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005). Desta forma, este tipo de queijo, ou seja, com adição de microrganismos probióticos passaria a ter alegações funcionais (FRITZEN-FREIRE et al., 2010a).

O desenvolvimento de um queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala probiótico apresenta caráter inovador, no entanto, quando a formulação de um queijo é modificada e um novo ingrediente é incorporado, este pode ter as suas propriedades físicas modificadas e, desta forma ter a sua aceitabilidade comprometida (LOBATO-CALLEROS et al., 2007). Durante a fabricação de queijos vários fatores contribuem para a modificação de suas propriedades. Estes fatores incluem o teor de umidade da coalhada (corte da coalhada, duração da agitação, entre outros), acidez e pH. Além disso, durante o seu armazenamento a estrutura da rede de caseína pode ser afetada pelo teor de proteína, gordura e água, bem como pelas atividades bioquímicas que ocorrem continuamente (GUNASEKARAM; AK, 2003).

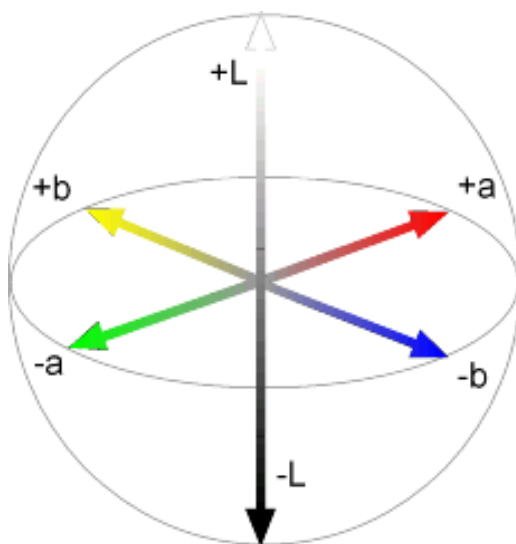
Everett (2007) afirma que as mudanças bioquímicas podem também afetar a microestrutura de queijos. Desta forma, visando compreender ainda mais as propriedades físicas de queijos, Everett e Auty (2008) recomendam a caracterização morfológica utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). McKenna (2003) e Joshi, Muthukumarappan e Dave (2004) afirmam que compreender a

microestrutura de um tipo de queijo permite desenvolver estratégias para melhorar e controlar as suas propriedades funcionais.

Montesinos-Herrero et al. (2006), Mounsey e O’Riordan (2008), Kuo e Gunasekaran (2009) e Morales-Celaya et al. (2012) sugerem o uso da MEV em queijos, pois esta é uma potencial ferramenta utilizada com sucesso para avaliar a estrutura da rede formada durante no processamento. Auty (2010) e Ong et al. (2012) relataram que a adição de coalho no leite forma uma rede de gel tridimensional resultante da agregação das proteínas. Dentro desta rede ficam também os glóbulos de gordura, a água, sais minerais, entre outros (AUTY, 2010; ONG et al., 2012). No entanto, Kuo e Gunasekaran (2009), Morales-Celaya et al. (2012) e Ong et al. (2012) concordam que a microestrutura depende dos componentes do leite, da formulação, do processamento e das condições de armazenamento do queijo. Além de avaliar a relação entre a composição físico-química e as propriedades viscoelásticas de queijo tipo Minas Frescal, Fritzen-Freire et al. (2010a) também utilizaram a MEV para confirmar a presença da bactéria probiótica *Bifidobacterium* BB-12 adicionada em suas formulações. Fritzen-Freire et al. (2010b) ressaltam que mudanças no processamento de queijo podem também gerar mudanças na cor.

A análise da cor é considerada importante porque é capaz de indicar a qualidade (DELAHUNTY; DRAKE, 2004) e influenciar na aceitabilidade de queijos pelos consumidores (DUFOSSE et al., 2005; WADHWANI; MCMAHON, 2012). Com a intenção de estabelecer um padrão de cor, em 1976, a *Commission Internationale d’Eclairage* (CIE) recomendou o uso da escala de cor CIELAB ou CIE $L^*a^*b^*$ (LANCASTER et al., 1997; WU; SUN, 2013). A determinação instrumental da cor mais utilizada em queijos é através do uso de um colorímetro, que emprega a escala CIEL $^*a^*b^*$ (FRANCIS, 1995; CUNHA; DIAS; VIOTTO, 2010), representada na Figura 2 (HUNTERLAB, 1996). Nesta escala os intervalos de L^* representam a luminosidade que pode variar de 0 a 100. Quanto mais próxima a medida de 0 representa que a amostra é branca (clara), enquanto mais próxima de 100, representa ser mais preta (escura). Já a medida a^* com valores positivos indica a aproximação da cor vermelha, enquanto valores negativos indicam a aproximação ao verde. Nos valores de b^* positivos e negativos, têm-se a variação da cor entre o amarelo e o azul, respectivamente (BUFFA et al., 2001; CAPELAS et al., 2001; DUFOSSE et al., 2005).

Figura 2: Coordenadas tridimensionais utilizadas na medida instrumental da cor.



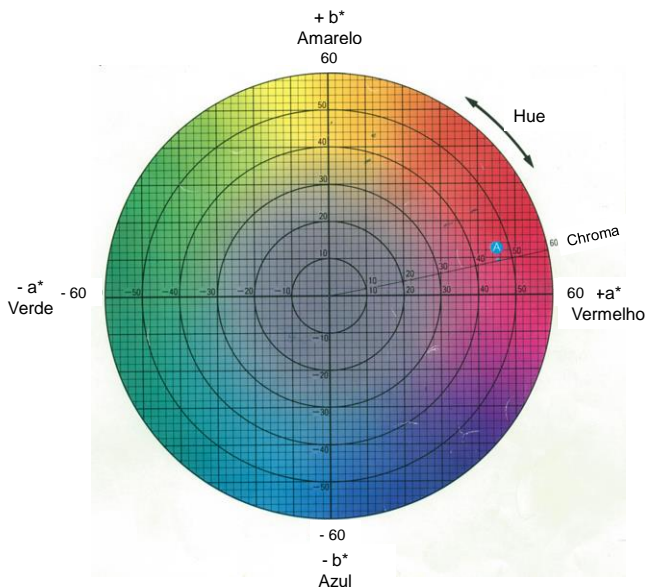
Fonte: HUNTERLAB (1996).

Os valores delta (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) indicam quanto a amostra diferiu do padrão para L^* , a^* e b^* , sendo frequentemente empregados no controle de qualidade (WU; SUN, 2013), além de serem utilizados no cálculo de diferença total de cor, através da equação: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (BUFFA et al., 2001; CAPELAS et al., 2001). Em queijos as medições de cor são também realizadas em termos do ângulo Hue e Chroma. O ângulo Hue, mostra a localização da cor em um diagrama onde 0° , 90° , 180° e 270° representam o vermelho puro, o amarelo puro, o verde puro e o azul puro, respectivamente. Já o ângulo Chroma é descrito como a intensidade ou saturação da cor e, é definido pela distância do ângulo Hue do centro do diagrama de cor (Figura 3) (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2002; VARGAS et al., 2008).

1.4 Análise reológica

Assim como as propriedades microestruturais e de cor, Dimitreli e Thomareis (2008) recomendam a determinação das propriedades reológicas de queijos. Os dados obtidos através da análise reológica podem ser relacionados às propriedades microestruturais (DIMITRELI; THOMAREIS, 2008).

Figura 3: Representação do diagrama instrumental da cor com localização do ângulo Hue (h^*) e Chroma (C^*).



Fonte: HUNTERLAB (1996), com modificações.

A reologia tem como definição o estudo da deformação e do fluxo de materiais quando este é submetido a forças externas. Assim, a reologia está preocupada principalmente com a relação entre tensão, deformação e tempo. Usando esses dados, é possível obter as propriedades verdadeiras do material independente do tamanho e da geometria, além de comparar os resultados dos testes com amostras de diferentes tamanhos e geometrias. Quando sujeito a forças externas, sólidos (ou materiais verdadeiramente elásticos) irão deformar, enquanto líquidos (ou materiais verdadeiramente viscosos) irão fluir (GUNASEKARAM; AK, 2003).

Análises reológicas são importantes ferramentas para estudar e identificar as propriedades estruturais de queijos. Estas ferramentas lidam com a deformação da amostra, utilizando diferentes tipos de instrumentos. Os resultados dos ensaios de pequenas e grandes deformações são interpretados para compreender o efeito da composição, modificações no processo, armazenamento, entre outras variáveis (JOSHI et al., 2004). As variáveis do queijo que são analisadas

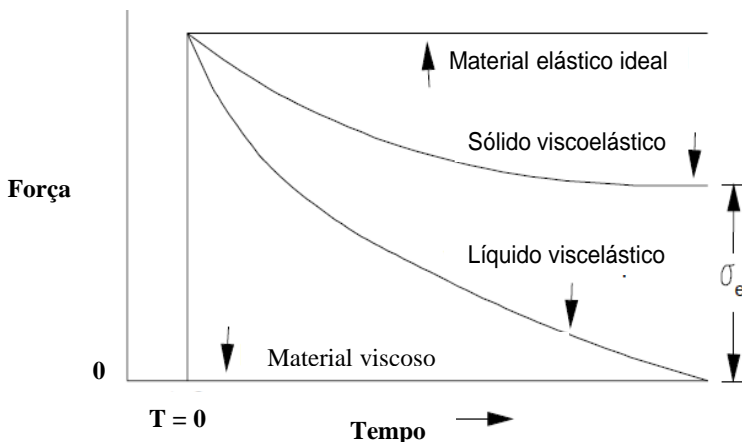
com testes reológicos podem também estar relacionadas à sua composição, como por exemplo, umidade, lipídeos e proteínas (FOX et al., 2000; DIMITRELI, THOMAREIS, 2008; GUINEE, 2011); a microestrutura, que é capaz de representar a distribuição espacial dos componentes da composição e as suas atrações intra e intermoleculares; assim como o estado físico dos constituintes, como a gordura que pode ser afetada pela temperatura, pela hidratação da matriz proteica, entre outros. O conhecimento das propriedades reológicas de queijos é de grande interesse para a indústria, pois conhecendo o seu comportamento físico, como a sua tendência à fratura e à flexibilidade, é possível adequar o processamento, além de programar as operações e equipamentos envolvidos. É ainda necessário conhecer a capacidade de algumas variedades de queijos serem capazes de manter uma determinada forma diante de alterações como retenção de gás e formação de olhaduras e/ou rachaduras (GUINEE, 2011).

Reologicamente, o queijo é classificado como um material viscoelástico, isto é, sua relação tensão-deformação lhe dá propriedades tanto de sólido como de líquido (GUNASEKARAM; AK, 2003; GUINEE, 2011). Gunasekaram e Ak (2003) relatam que uma forma de avaliar o comportamento viscoelástico de queijos é através do teste de relaxação. Este teste envolve a aplicação de uma deformação instantânea à amostra e a manutenção desta deformação ao longo da avaliação (STEFFE, 1996; GUNASEKARAM; AK, 2003). Em uma curva de relaxação típica de materiais viscoelásticos ocorre uma queda exponencial da força/tensão em função do tempo até um valor constante, mas diferente de zero (Figura 4) (GUNASEKARAM; AK, 2003). No entanto, a ausência de relaxação é observada em sólidos elásticos ideais, enquanto materiais viscosos ideais relaxam instantaneamente. O teste de relaxação (Figura 5) pode ser conduzido através da tensão ou compressão uniaxial (STEFFE, 1996).

Gunasekaram e Ak (2003) relatam que quando somente a direção do esforço aplicado ao queijo é considerada, a tensão uniaxial é o oposto da compressão uniaxial. No entanto, uma diferença mais fundamental entre tensão e ensaios de compressão é a taxa de deformação. Quando uma amostra é deformada em uma velocidade constante, a velocidade de deformação na tensão diminui, mas aumenta em compressão (GUNASEKARAM; AK, 2003). Alguns modelos matemáticos são propostos para descrever as curvas de relaxação de queijos e, desta forma, predição dos parâmetros (MEZA, VERDINI, RUBIOLO, 2012). Podem ser utilizados modelos matemáticos como o de Maxwell e Maxwell generalizado (LI et al., 2010; ANDRES;

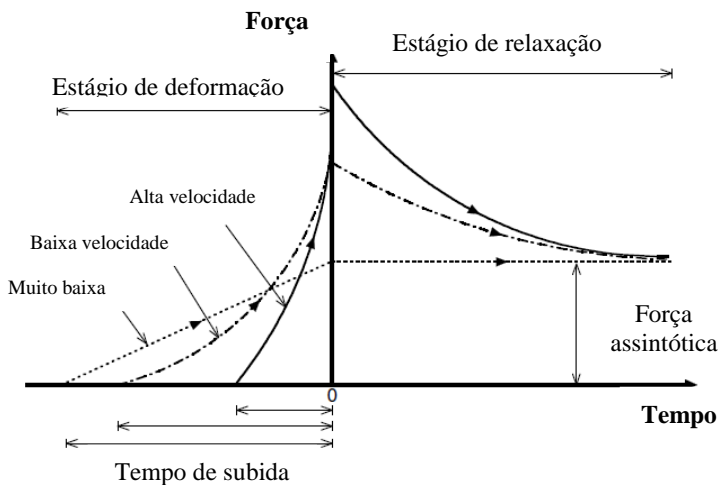
ZARITZKY; CALIFANO, 2008; BHATTACHARYA, 2010) ou empíricos, como o de Peleg (BUFFA et al., 2001; ROMEIH et al., 2002; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a).

Figura 4: Curva típica do teste de relaxação.



Fonte: Steffe (1996).

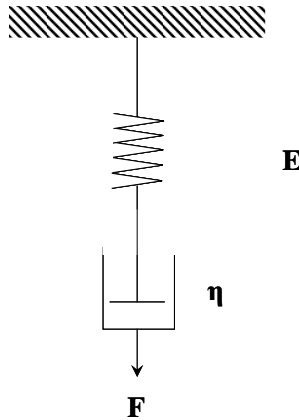
Figura 5: Curva típica dos estágios de deformação e relaxação obtida no teste de relaxação.



Fonte: Gunasekaram e Ak (2003).

O modelo mais simples e mais comumente utilizado para explicar a viscoelasticidade de sólidos e semi-sólidos é o corpo de Maxwell (Figura 6), modelo de dois elementos, composto por um sólido elástico ideal (representado por uma mola) conectado em série com um fluido newtoniano (representado por um amortecedor). Assim, a deformação total (ε) (Equação 1) representa a soma da deformação dos dois elementos e a tensão (σ) (Equação 2) é equivalente nos dois elementos (COSTELL; FISZMAN; DURÁN, 1997).

Figura 6: Representação esquemática do modelo de Maxwell.



Fonte: Costell, Fiszman e Durán (1997).

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_{\eta} + \varepsilon_E \quad (1)$$

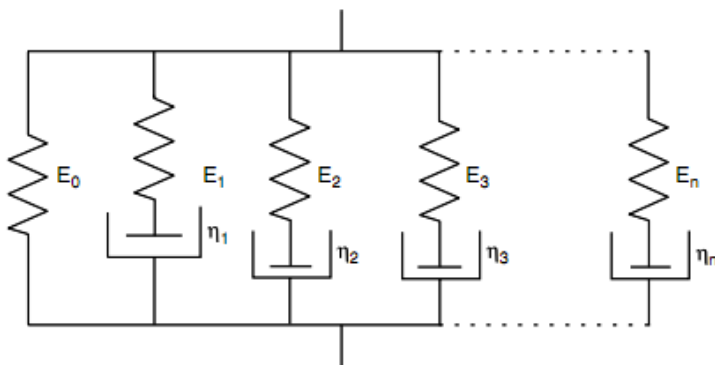
$$\sigma(t) = \sigma_{\eta} = \sigma_E \quad (2)$$

onde ε é a deformação do elemento elástico, σ é a tensão e os sub-índices η e E são referentes aos elementos viscoso e elástico, respectivamente.

Porém alguns alimentos viscoelásticos não seguem o modelo simplificado de Maxwell, necessitando de modelos mais complexos para descrever seu comportamento (RAMOS, 2013). Desta forma, o modelo

generalizado de Maxwell (Figura 7) tem sido utilizado para a descrição do comportamento de testes de relaxação em substituição ao modelo simplificado de Maxwell (PELEG; NORMAND, 1983), sendo representado pela Equação 3. Este modelo consiste em um número infinito de modelos de Maxwell mais uma mola em paralelo que representa a tensão residual. Para a maioria dos casos, modelos com dois corpos de Maxwell e um elemento elástico são suficientes para representar o comportamento mecânico do material (RAO, 1992). Normalmente é apresentado como observado na Equação 3 (ANDRES, ZARITZKY; CALIFANO, 2008; BHATTACHARYA, 2010).

Figura 7: Representação esquemática do modelo de Maxwell generalizado



Fonte: Peleg e Normand (1983).

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 [E_1 x \exp(-t / \lambda_1) + E_2 x \exp(-t / \lambda_2) + E_e] \quad (3)$$

onde ε_0 é a deformação, E_1 e E_2 são os módulos de elasticidade, E_e é o módulo de elasticidade de equilíbrio, e λ_1 e λ_2 são os tempos de relaxação. Os módulos viscosos (η_1 e η_2) podem ser calculados através da Equação 4 (RODRIGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009).

$$\lambda = \eta / E \quad (4)$$

Peleg (1979) propôs a linearização da curva do modelo de Maxwell generalizado com o objetivo de simplificar a análise dos

parâmetros reológicos de alimentos. No modelo de Peleg, os dados da relaxação podem ser interpretados por dados da força normalizada *versus* o tempo, como representado na Equação 5 (PELEG; NORMAND, 1983).

$$\frac{F_{(t)}}{F_0} = 1 - \frac{c_1 \cdot t}{c_2 + t} \quad (5)$$

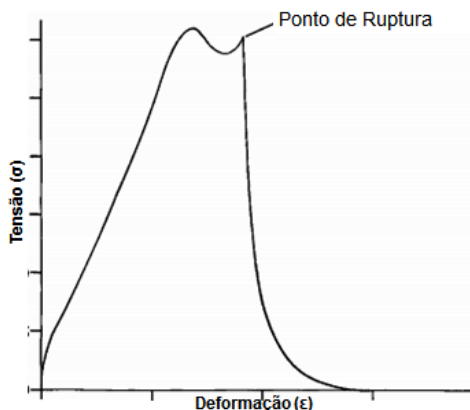
onde $F_{(t)}$ é a força instantânea durante o tempo de relaxação (t) e F_0 é a força máxima inicial. Os parâmetros c_1 e c_2 são estimados por regressão não linear.

A utilização de um modelo empírico como o de Peleg é uma maneira simples de descrever e comparar a força de relaxação com dados da literatura sobre reologia, uma vez que utiliza somente dois parâmetros que fornecem informações sobre as características viscoelásticas do material: $1-c_1$ e c_1/c_2 . O valor de $1-c_1$ pode ser visto como o “grau de solidez”, enquanto a razão de c_1/c_2 representa a taxa inicial de decaimento da força. O grau de solidez está associado ao comportamento global do material. Assim, quando $t \rightarrow \infty$, $F(t)/F_0 \rightarrow 1 - c_1$, observa-se que o material relaxa totalmente se $c_1 = 1$ e $1 - c_1 = 0$, ou seja, $1 - c_1$ serve como um indicativo do grau de solidez do alimento, onde numa escala de 0 a 1, 0 é considerado líquido e 1 sólido elástico ideal (BHATTACHARYA; NARASIMHA; BHATTACHARYA, 2006; RODRÍGUEZ-SANDOVAL; FERNÁNDEZ-QUINTERO; CUVELIER, 2009).

Além dos testes de relaxação, outra maneira de avaliar as propriedades reológicas de queijos é o teste de compressão uniaxial (BUFFA et al., 2001; ROMEIH et al., 2002; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a). No teste de compressão uniaxial, uma amostra, de forma e tamanho conhecidos, é colocada entre duas placas paralelas, onde a superior é movida para baixo a uma velocidade constante, enquanto é formada uma curva de força em função do tempo (ROHM; JAROS, 2011a). Os dados resultantes de força *versus* tempo são convertidos em valores de tensão e deformação e assim parâmetros reológicos como o módulo de elasticidade podem ser calculados (GUNASEKARAM; AK, 2003). Um valor mais elevado do módulo de elasticidade, corresponde a uma maior rigidez do material, além disso, é importante salientar que o módulo de elasticidade é calculado a partir da parte inicial dos dados de tensão-deformação e por isso a amostra deve apresentar extremidades

perfeitamente planas e paralelas para a determinação precisa deste parâmetro (GUNASEKARAM; AK, 2003). Durante a realização do teste a força aplicada é grande o suficiente para ocasionar a fratura da amostra (Figura 8), e a partir disso pode-se obter dados como tensão de ruptura (σ_R) e deformação de ruptura (ϵ_R) (TUNICK, 2000). Em queijos a tensão de ruptura é aceita como uma medida instrumental de firmeza, enquanto a deformação de ruptura é uma medida instrumental da elasticidade (FOX et al., 2000). Além do módulo de elasticidade, vários outros parâmetros significativos podem ser determinados a partir das curvas de tensão-deformação tal como o limite de proporcionalidade, limite de elasticidade, resistência ao escoamento, resistência final, flexibilidade, entre outros (GUNASEKARAM; AK, 2003).

Figura 7: Curva típica do teste de compressão uniaxial em amostras de queijo



Fonte: Tunick (2000).

Referências

ABADÍA-GARCÍA, L.; CARDADOR, A.; DEL CAMPO, S. T. M.; ARVÍZU, S. M.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.; AMAYA-LLANO, S. L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of

probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 191-197, 2013.

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Laticínios. 2013. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/laticinios.html>. Último acesso em: 11 fev. 2014.

AKALIN, A. S.; UNAL, G.; DINKCI, N.; HAYALOGLU, A. A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3617-3628, 2012.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalos: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 106-110, 2005.

ANDRÉS, S. C.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Stress relaxation characteristics of low-fat chicken sausages made in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 589-594, 2008.

ANJOS, D. A. A.; VAN DENDER, A. G. F.; ALVES, A. T. S.; SPADOLI, L. M. Avaliação Instrumental de Textura em Requeijão no Processo de Produção e Estocagem. In: **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**, VAN DENDER, A. G. F. (ed.). Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Campinas – SP. 2006. 392p.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: a consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 223–228, 2011.

ANZALDÚA-MORALES, A. **La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica**. Zaragoza: Acribia, 1994. 198p

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366–376, 2011.

AUTY, M. Microscopy (Microstructure of Milk Constituents and Products). In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 226-234. San Diego: Academic Press, 2010.

BAUMAN, D. E.; PERFIELD, J. W.; LOCK, A. L. Effect of trans fatty acids on milk fat and their impact on human health. In: **Proceedings Southwest Nutrition & Management Conference**, Tempe, AZ. p. 41-52, 2004.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BERRA, B.; COLOMBO, I.; SOTTOCORNOLA, E.; GIACOSA, A. Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 193-197, 2002.

BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 539-546, 2010.

BHATTACHARYA, S.; NARASIMHA, H. V.; BHATTACHARYA, S. Rheology of corn dough with gum arabic: stress relaxation and two-cycle compression testing and their relationship with sensory attributes. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, p. 89-95, 2006.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, v.35, p.125-131, 2002.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p.375-387, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.4 de 1º de março de 2004. Altera o regulamento

técnico de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.

BUFFA, M. N.; TRUJILLO, A. J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 927-934, 2001.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 07-11, 2009.

CAPELAS, M.; MOR-MUR, M.; SENDRA, E.; GUAMIS, B. Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats' milk cheese (*Mató*). **International Dairy Journal**, v. 11, p. 165-173, 2001.

CARRILLO, E.; PRADO-GASCO, V.; FISZMAN, S.; VARELA, P. Why buying functional foods? Understanding spending behaviour through structural equation modelling. **Food Research International**, v. 50, p. 361-368, 2013.

CHAVES, A. C. S. D. Leite. In: **Matérias-Primas Alimentícias, Composição e Controle de Qualidade**. KOBLITZ, M. G. B. (ed). Primeira edição, p. 145-185, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CHEN, C.; WALKER, W. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in Pediatric**, v. 52, p. 77-113, 2005.

CHONG, C. H.; LAW, C. L.; CLOKE, M.; HII, C. L.; ABDULLAH, L. C.; DAUD, W. R. W. Drying kinetics and product quality of dried Chempedak. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 522-527, 2008.

COSTELL, E.; FISZMAN, S. M.; DURÁN, L. Propiedades Físicas I, Reología de Sólidos y Textura. In: AGUILERA, J. M. (Ed.). **Temas em Tecnologia de Alimentos**, CYTED –Programa Iberoamericano de Ciencia e Tecnologia para el desarrollo, Cap. 6, p. 213 – 259, 1997.

CUNHA, C. R.; DIAS, A. I.; VIOTTO, W. H. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. **Food Research International**, v. 43, p. 723–729, 2010.

DE FRANCISCIS, G; DI PALO, R. Buffalo milk production. In: **World Buffalo Congress**, 4, 1994, São Paulo, SP. Proceedings... São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, p. 137-145, 1994.

DELAHUNTY, C. M.; DRAKE, M. A. Sensory character of cheese and its evaluation. In: **Cheese; Chemistry, Physics and Microbiology**, Volume 1, General Aspects, FOX, P. F; MCSEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (eds), Elsevier, London, Capítulo 19, p. 455-487, 2004.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 368–374, 2008.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; CARLET, E.; FLAMIN, C.; VALLA, A. Spectrocolorimetry in the CIE L*a*b* color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. **Food Research International**, v.38, p. 919–924, 2005.

ECKLES, C. H.; WILLES, B. C.; HAROLD, M. **Milk and Milk Products: Prepared for the Use of Agricultural College Students**. 4^a ed. New Dehli. 2001. 325 p.

EL-ZEINI, H. M. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 15, p. 147–154, 2006.

ENB, A.; ABOU DONIA, M. A.; ABD-RABOU, N. S.; ABOU-ARAB, A. A. K.; EL-SENAITY, M.H. Chemical Composition of Raw Milk and Heavy Metals Behavior During Processing of Milk Products. **Global Veterinaria**, v. 3, p. 268-275, 2009.

EVERETT, D. W. Microstructure of natural cheeses. In: **Structure of Dairy Products**. A. Y. TAMIME (Ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 759-773, 2008.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. **In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin a carotenoids in foods**. HarvestPlus Technical Monograph 3; International Food Policy Research Institute and International Center of Tropical Agriculture: Washington, DC, 2005.

FAO/WHO. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guideline for evaluation**. Córdoba, 2006. 54p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em 15 abril de 2014.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 511-516, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

FRANCIS, F. J. Quality as influenced by color. **Food Quality and Preference**, v. 6, p. 149-155, 1995.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of *Bifidobacterium* BB-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621–627, 2010a.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 561-568, 2010b.

GANGULI, N. C. Milk processing and marketing. In: **Production in Subseries: Production –System Approach World Animal Science**, Tulloh, N. M.; Holmes, J. H. G. (eds.), p. 393–411, London:Elsevier, 1992.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological, and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 139–157, 1999.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**, GONZÁLEZ, F. H. D; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. (eds). Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001. 72p.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, J. M.; CHIRA, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 334–340, 2002.

GUERRA, R. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, p. 443-447, 2005.

GUINEE, T. P. Cheese Rheology. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 685-697. San Diego: Academic Press, 2011.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. **Cheese Rheology and Texture**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2003. 434p.

HAN, B.Z.; MENG, Y.; LI, M.; YANG, Y.X.; REN, F.H.; ZENG, Q.K.; NOUT, M. J. R. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, p. 742-746, 2007.

HUNTERLAB. Hunter Associates Laboratory. **Applications note: CIE L* a* b* color scale**. Virginia, v. 8, p. 16-24, 1996.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A.; BELL, A. Effects of gelation temperature on the mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: curd yield, overall quality & casein fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1404-1410, 2012.

IDF. International Dairy Federation. **The World Dairy Situation 2012**. Bulletin of the IDF n°.458/2012, 2012. 235p.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, p. 64-74, 2013.

JIN BAEK, Y.; LEE, B. H. Probiotics and Prebiotics as Bioactive Components. In: **Dairy Products, in Bioactive Components in Milk and Dairy Products**, Y. W. Park (ed.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 2009. 439p.

JOSHI, N. S.; JHALA, R. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; ACHARYA, M. R.; MISTRY, V. V. Textural and rheological properties of processed cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 7, p. 519-530, 2004.

JOSHI, N. S.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; DAVE, R. I. Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1975–1985, 2004.

KUO, M.; GUNASEKARAN, S. Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 9–16, 2009.

LANCASTER, J. E.; LISTER, C. E.; READY, P. F.; TRIGGS, C. M. Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 122, p. 594–598, 1997.

LOBATO-CALLEROS, C.; REYES-HERNÁNDEZ, J.; BERISTAIN, C. I.; HORNELAS-URIBE, Y.; SÁNCHEZ-GARCÍA, J. E.; VERNON-CARTER, E. V. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey concentrate in partial or total replacement of milk fat. **Food Research International**, v. 40, p. 529–537, 2007.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.

MAKELAINEN, H.; FORSSTEN, S.; OLLI, K.; GRANLUND, L.; RAUTONEN, N.; OUWEHAND, A. C. Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 675–683, 2009.

MARCATTI, B.; HABITANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Minas-type fresh cheese developed from buffalo milk with addition of *L. acidophilus*. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 481–485, 2009.

MCKENNA, B. M. **Texture in Food. Semi-Solid Foods** (Vol. 1). Boca Raton, FL: CRC Press. p. 362–363, 2003.

MEHINAGIC, E.; ROYERA, G. E.; BERTRAND, D.; SYMONEAUX, R.; LAURENS, F.; JOURJON, F. Relationship between sensory

analysis, penetrometry and visible NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. **Food Quality and Preference**, v.14, p. 473-484, 2003.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3.ed., Boca Raton, Flórida: CRC Press, 387 p., 2007.

MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; GAUCHERON, F. LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v. 120, p. 544–551, 2010.

MEZA, B. E.; VERDINI, R. A.; RUBIOLO, A. C. Temperature dependency of linear viscoelastic properties of a commercial low-fat soft cheese after frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 475–481, 2012.

MONTESINOS-HERRERO, C.; COTTELL, D. C.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Partial replacement of fat by functional fibre in imitation cheese: Effects on rheology and microstructure. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 184-198, 2006.

MORALES-CELAYA, M. F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 132-141, 2012.

MOUNSEY, J. S.; O'RIORDAN, E. D. Influence of pre-gelatinised maize starch on the rheology, microstructure and processing of imitation cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 57–64, 2008.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 13-126, 1999.

NETO, O. C. C.; OLIVEIRA, C. A. F. HOTTA, R. M.; SOBRAL, P. J. A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido

com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 5-12, 2005.

NOH, S. K.; KOO, S. I. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2611–2616, 2004.

O’CONNOR, E. B.; BARRETT, E.; FITZGERALD, G.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Production of Vitamins, Exopolysaccharides and Bacteriocins by Probiotic Bacteria. In: **Probiotic Dairy Products**, TAMIME, A. (ed), Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 167- 194, 2005.

O’MAY, G. A.; MACFARLANE, G. T. Health Claims Associated with Probiotics. In: **Probiotic Dairy Products**, TAMIME, A. (ed), Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 138–159, 2005.

OLIVEIRA, G. J. C.; ALMEIDA, A. M. L.; SOUZA, U. A. **O búfalo no Brasil**. Cruz das Almas: UFBA, 1997. 236p.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, p. 1-21, 2002.

ONG, L.; DAGASTINE, R. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 48, p. 119–130, 2012.

ORTAKCI, F.; BROADBENT, J. R.; MCMANUS, W. R.; MCMAHON, D. J. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6274-6281, 2012.

PANDE, R.; BAGAD, M.; DUBEY, V.; GHOSH, A. J. Prospectus of probiotics in modern age diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1963-1974, 2012.

PATEL, R. S.; MISTRY, V. V. Physicochemical and structural properties of ultrafiltered buffalo milk and milkpowder. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 812-817, 1997.

PELEG, M. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, p. 277-281, 1979.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid foods. **Rheological Acta**, Cambridge, v. 22, p. 108-113, 1983.

PONS, M.; FISZMAN, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, p. 597-624, 1996.

RAMOS, T. M. Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do queijo tipo prato. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Lavras, 2013. 231 p

RAO, V. N. M. Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. (Ed.) **Viscoelastic Properties of Solid foods**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1992. Cap. 1, p. 3-47.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 202-206, 2009.

ROHM, H.; JAROS, D. Principles and Significance in Assessing Rheological and Textural Properties In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 264-273. San Diego: Academic Press, 2011b.

ROHM, H.; JAROS, D. Rheological Methods: Instrumentation. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 272-278. San Diego: Academic Press, 2011a.

ROMEIH, E. A.; MICHAELIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; ZERFIRIDIS, G. K. Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 525–540, 2002.

RUSSELL, D. A.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 88–105, 2011.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1–16, 2013.

SALMINEN, S.; KENIFEL, W.; OUWEHAND, A. C. Probiotics, Applications in Dairy Products. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 503–511. San Diego: Academic Press, 2011.

SANDERS, M. E.; MARCO, M. L. Food formats for effective delivery of probiotics. **Food Science and Technology**, v. 1, p. 65–85, 2010.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691–697, 2010.

SHAH, N. P. *Bifidobacterium* spp.: Applications in Fermented Milks. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 389–394. San Diego: Academic Press, 2011a.

SHAH, N. P. *Bifidobacterium* spp.: Morphology and Physiology. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 381–388. San Diego: Academic Press, 2011b.

SHINDHU, J. S.; ARORA, S. Buffalo Milk. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.), Second Edition, vol. 1, pp. 503–511. San Diego: Academic Press, 2011.

SINGH, H.; BENNETT, R. J. Milk and milk processing. In: **Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products**, ROBINSON, R. K. (ed.), United States: John Wiley & Sons Inc, p. 1 – 38, 2002.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, E. A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G.; LEMMETTI, F.; GIUDICI, P. Tailoring the probiotic potential of non-starter Lactobacillus strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, p. 240-249, 2014.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 491-496, 1998.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press, 1996. 418p.

TAMIME, A. Y.; SAARELA, M.; SONDERGAARD, A. K.; MISTRY, V. V.; SHAH, N. P. Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. In: **Probiotic Dairy Products**, TAMIME, A. (ed), Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 39-63, 2005.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de Búfala na Indústria de Produtos Lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 96-100, 2005.

THAMER, G. K.; PENNA, B. A. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 1-13, 2005.

TRUONG, V. D.; DAUBERT, C. R. Comparative study of large strain methods in assessing failure characteristics of selected food. **Journal of Texture Studies**, v. 31, p. 335-353, 2000.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1892-1898, 2000.

URALA, N.; LÄHTEENMÄKI, L. Consumers' changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and Preference**, v. 18, p. 1-12, 2007.

VARGAS, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1146-1152, 2008.

VARRICCHIO, M. L.; DI FRANCIA, A.; MASUCCI, F.; ROMANO, R.; PROTO, V. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 509-511, 2007.

VERBECKE, W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 126-131, 2006.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 131-137, 1994.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação química e nutricional do queijo Mozzarella e iogurte de leite de búfala. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 438-443, 1993.

WADHWANI, R.; MCMAHON, D. J. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2336-2346, 2012.

WU, D.; SUN, D. Colour measurements by computer vision for food quality control: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, p. 5-20, 2013.

Capítulo 2

Propriedades reológicas de queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala adicionado de *Bifidobacterium* BB-12 em função do tempo de armazenamento

* Artigo submetido e atualmente em revisão no *Journal of Food Engineering* (ISSN: 0260-8774), cujo comprovante da submissão encontra-se no Anexo A.

Propriedades reológicas de queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala adicionado de *Bifidobacterium* BB-12 em função do tempo de armazenamento

Rheological behavior and protective effect of buffalo Minas Frescal cheese matrix on probiotic strain as a function of storage time

Resumo

O queijo tipo Minas frescal do leite de búfala contendo *Bifidobacterium* BB-12 foi avaliado quanto à viabilidade da cultura probiótica e quanto às suas propriedades físico-químicas, de cor, reológicas e microestruturais, durante 30 dias de armazenamento. As amostras de queijo contendo as bifidobactérias foram classificadas como probióticas. Entretanto, após este período, estas amostras mostraram aumento nos valores de sinérese, enquanto que os demais parâmetros físico-químicos avaliados permaneceram inalterados e tendência à coloração branca. O modelo de Maxwell generalizado apresentou melhor ajuste aos dados experimentais do que os modelos de Maxwell e de Peleg. Como esperado, a adição de bifidobactéria e o tempo de armazenamento não afetaram as propriedades reológicas dos queijos tipo Minas Frescal do leite de búfala. Além disso, todos os queijos produzidos foram classificados como rígidos e elásticos, sendo, portanto mais elásticos do que viscosos.

Palavras-chave: queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala; bifidobactéria; reologia; viscoelasticidade; modelos de textura; tensão de relaxação.

Abstract

Buffalo Minas Frescal cheese produced with a probiotic culture was evaluated in relation to the viability of *Bifidobacterium* BB-12, physicochemical, color, rheological and microstructural properties during 30 days of storage. After this storage time, the cheeses samples with and without bifidobacteria showed an increase in the syneresis values, while the other physicochemical parameters remained unaltered. Both cheese samples also showed a tendency to white color. The generalized Maxwell model fits the experimental data better than the Maxwell and the Peleg models. As request, the addition of

bifidobacteria and the storage time of the buffalo Minas Frescal cheeses did not affect its rheological properties. These properties indicated a tendency to obtain stiff and elastic cheeses, showing a tendency to be more elastic than viscous.

Keywords: Buffalo Minas Frescal cheese; bifidobacteria; rheology; viscoelasticity; texture modeling; stress relaxation.

1. Introduction

Regardless of the type of milk, the Minas Frescal cheese is classified as a soft white fresh cheese, which is slightly salty, has a slight lactic acid taste and is produced by enzymatic coagulation of pasteurized milk with rennet and/or other appropriate coagulating enzymes. This type of cheese also shows high water activity and pH above 5.0, absence of preservatives, and its storage is at refrigeration temperatures for around 30 days. Besides, the higher lipid content present in buffalo cheese could offer more protection to some bacteria during their passage through the gastrointestinal tract, as noted by Calvo et al. (2007) and Ong, Henriksson and Shah (2006) for probiotic bacteria. Although some studies have tested the performance of many probiotic cultures in the production of bovine fresh cheese (BURITI et al, 2005a; FRITZEN-FREIRE et al, 2010a; SOUZA; SAAD, 2009), studies with buffalo milk cheese are scarce. Thus, the use of buffalo milk in the production of a probiotic Minas Frescal cheese represents an interesting alternative for increasing the value of this raw material.

Probiotics are viable microorganisms that are beneficial to the host's health when administered in appropriate quantities (FAO/WHO, 2006). Among the mostly used genera, the *Bifidobacterium* stands out for being one of the most widely used probiotics in functional dairy products (SCHELLER; O'SULLIVAN, 2011). Nevertheless, Fritzen-Freire et al. (2010b) emphasized that changes on the raw material, processing, and storage time of the Minas Frescal cheese could alter its physicochemical, color, microstructural and rheological properties, resulting in alteration of its acceptability by consumers. Based on these properties, Dimitreli and Thomareis (2007) reported that rheology is one of the most important aspects to consider when studying the body and texture of cheeses. On the other hand, Fox et al. (2000) stated that the rheology of cheese is related with its physicochemical and microstructural properties.

The approaches to analyze the rheological data are widely employed in research and in the food industry because of their practicability. Chen and Opara (2013) stated that it is paramount to choose suitable models for predicting texture properties. Bertola et al. (2000), Cunha, Viotto and Viotto (2006) and Hort and Le Grys (2001) employed empirical and mechanical models in order to describe the viscoelastic behavior of cheese. Like most solid foods, cheese is viscoelastic in nature, meaning that it has both solid (elastic) and fluid (viscous) behavior, and can be evaluated by uniaxial compression and stress relaxation tests, which are described by mathematical models (MESSENS et al., 2000). Thus, the goal of the present work was to evaluate the microbiological viability of probiotic culture *Bifidobacterium* BB-12 and its influence on the physicochemical, color and microstructural properties of buffalo Minas Frescal cheese during 30 days of storage under refrigeration. Moreover, its rheological properties were evaluated, after the same storage times, through uniaxial compression and stress relaxation tests. The stress relaxation data were modeled by Peleg, Maxwell and generalized Maxwell equations, aiming to determine the viscoelastic behavior of buffalo Minas Frescal cheese added with bifidobacteria.

2. Material and Methods

2.1 Material

Pasteurized buffalo milk (15.89 g total solids 100 mL⁻¹, 6.63 g lipid 100 mL⁻¹, 3.67 g protein 100 mL⁻¹, 0.84 g ash 100 mL⁻¹ and 4.75 g carbohydrates 100 mL⁻¹), calcium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), probiotic culture composed of *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12®, Chr. Hansen, Hónsholm, Denmark), lactic acid (Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brazil), and commercial rennet (Ha La®, Chr. Hansen, Valinhos, Brazil) were used. For microbiological analysis were used MRS agar (Difco, Sparks, USA), sodium propionate (Fluka, Neu-Ulm, Germany), lithium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), and AnaeroGen® (Oxoid, Hampshire, UK). All the chemicals used were of analytical grade.

2.2 Manufacture of buffalo Minas Frescal cheeses

A probiotic buffalo Minas Frescal cheese was manufactured based on the methodology proposed by Souza and Saad (2009), with modifications. The cheese was produced in a 5 L vat from pasteurized buffalo milk heated to 37 ± 1 °C, with addition of lactic acid (0.25 mL L^{-1} of a 85% lactic acid solution) and probiotic culture. The culture employed was a commercial freeze-dried culture for direct vat inoculation and was added at 0.15 g L^{-1} of buffalo milk. Calcium chloride (0.4 mL L^{-1} of a 40% calcium chloride solution) and commercial rennet with a ratio of 1:3000 (0.9 mL L^{-1} of buffalo milk) were added with posterior incubation at 37 ± 1 °C for 40 min. The resulting gel was gently cut into cubes of about approximately 1.5 cm^3 , allowed to drain, and placed in cylindrical perforated containers (ca. 500 g capacity), however for a better drainage it was kept overnight under refrigeration (5 ± 1 °C). The product obtained was salted in brine (200 g L^{-1} of sodium chloride) at 5 ± 1 °C for 1 h and then was vacuum sealed in plastic bags Cryovac® (BN 200, São Paulo, Brazil) and stored at refrigeration (5 ± 1 °C) for 30 days. Buffalo Minas Frescal cheese without the probiotic culture addition was also produced as a control. The yield of both buffalo Minas Frescal cheeses were calculated as the weight of cheese obtained (g), divided by the volume (mL) of milk used for each one and multiplied by 100. The buffalo cheeses (probiotic and control) were evaluated on day 1 and on day 30 of storage. All analyses were carried out in triplicate.

2.3 Microbiological analysis

The viability of the bifidobacteria was evaluated in the probiotic cheese. For this purpose, 25 g portions of cheese samples were blended with 225 mL of $0.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ peptone water in a Bag Mixer 400 (Interscience, St. Nom, France) and submitted to serial dilutions with the same diluent. For the enumeration of probiotic culture, MRS agar modified with the addition of $0.2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of lithium chloride and $0.3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of sodium propionate was used according to Vinderola and Reinheimer (2000). The plates were incubated in anaerobic jars containing AnaeroGen® at 37 ± 1 °C for 72 h. After the incubation period, the count of probiotic viable cells was carried out, expressed as log colony-forming units per gram (log CFU g^{-1}). All analyses were determined in triplicate.

2.4 Physicochemical analysis

Both buffalo Minas Frescal cheeses were analyzed for total solids contents ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), obtained by drying to constant weight at 105°C , and for lipid contents ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) by Soxhlet extraction with ether as described by the Analytical Norms of the Adolfo Lutz Institute (IAL, 2005). The protein content ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) was estimated through the determination of the total nitrogen content by Kjeldahl method ($\text{N} \times 6.38$) and the ash ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) according to AOAC (2005). The total carbohydrates ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) were obtained by difference.

The acidity (% lactic acid) of the cheeses was determined according to AOAC (2005), while the measurements of the pH values were obtained using a pHmeter (MP220, Metler-Toledo, Greinfensee, Switzerland). All analyses were carried out in triplicate.

2.5 Syneresis

The syneresis of cheese samples were calculated according to Souza and Saad (2009) through to the Equation (1) where w_w (g) is the weight of whey released from each cheese in its package, after the different times of storage (1 and 30 day) and w_c (g) is the weight of cheese in the same package.

$$\text{Sinerese}(\%) = \frac{[w_w (g)]}{[w_c (g)]} \times 100 \quad (1)$$

2.6 Color analysis

The color analysis of the cheeses samples were determined using a colorimeter Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan), adjusted to operate with D65 lightning and 10° of observation angle. The colorimeter was calibrated with a white standard plate and to measure the L^* , b^* and a^* parameters was used the CIELab color scale. The L^* parameter ranges 0 to 100 and indicates luminosity (variation from black to white), the b^* axis is the variation from yellow (+ b^*) to blue (- b^*) and the a^* axis shows the variation from red (+ a^*) to green (- a^*). The total difference of color (ΔE^*) between the measured values in the final time (day 30) and initial time (day 1) of

storage was calculated according to Okpala, Piggott and Schaschke (2010), as described in Equation (2),

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2)$$

where ΔL^* is the difference of luminosity for the same sample of cheese, between day 1 and day 30 of storage, while Δa^* represents the intensity of the red color and Δb^* the intensity of the yellow color. For both cheeses samples were made 21 measurements, being 18 on the outer surface and three in the inner surface. It was also determinate the value of Hue angle (h^*) and Chroma (C^*), using the Equations (3) and (4), respectively, as suggested by Masoud and Jakobsen (2003). All analyses were done in triplicate.

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (3)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

2.7 Rheological analysis

The uniaxial compression and stress relaxation tests of cheese samples were carried out using the TA.XT plus texture analyzer (Stable Micro Systems Ltd., texture exponent for Windows software, Surrey, United Kingdom) fitted with a 50 kg load cell and a 25 mm diameter aluminum probe. Five samples were prepared by removing cylindrical pieces from different points of each cheese samples (19 mm diameter, 20 mm height) which were then kept in refrigeration (5 ± 1 °C) until testing, without addition of any lubricants.

2.7.1 Uniaxial compression

The cylindrical cheese samples were compressed to 50% of their height at a cross-head speed of 1 mm s^{-1} . The instantaneous values of compression force applied $F(t)$ and the specimen height $H(t)$ were converted into engineering stress (σE) and engineering strain (ϵE) according to Equation (5) and Equation (6), as Moresi and Bruno (2007).

$$\sigma_E = \frac{F(t)}{A_0} \quad (5)$$

$$\varepsilon_E = \frac{H_0 - H(t)}{H_0} \quad (6)$$

where A_0 and H_0 are the initial cross-sectional area and height of each specimen.

The power law model proposed by Peleg and Campanella (1989) was used to describe the nonlinear relation between the stress-strain experiments, as shown in Equation (7):

$$\sigma_E = k\varepsilon_E^n \quad (7)$$

where k is the rigidity constant that represents a measure of the stiffness of the material, while n is the degree of concavity, that accounts the deviation from linearity. For $n = 1$, Equation (7) reduces to Hooke's law and k coincides with the modulus of elasticity, while for $n < 1$ or $n > 1$, a downward or upward concavity is accounted for.

2.7.2 Stress relaxation

The cheese samples were subjected to 10% compression for 60 s at a cross-head speed of 1 mm s^{-1} . Three methods, i. e., Peleg, Maxwell and generalized Maxwell models, were employed to describe the stress relaxation of cheese samples.

Firstly, the experimental results for the stress relaxation were normalized and analyzed through the empirical model proposed by Peleg (1980), shown in Equation (8):

$$\frac{F(t)}{F_0} = 1 - \frac{c_1 \cdot t}{c_2 + t} \quad (8)$$

where $F(t)$ is the force at time (t) ; F_0 is the initial force.

The parameters c_1 and c_2 were estimated by non-linear regression. In Peleg model, $1 - c_1$ and c_1/c_2 provide information about the viscoelastic properties of the samples.

The stress relaxation data were also interpreted in terms of mechanical methods, as Maxwell and generalized Maxwell models. For the static relaxation test, both linear viscoelastic models are generally developed from two elements, a spring and a dashpot. The spring element obeys the Hooke's law and the dashpot element the Newton's law.

A Maxwell model consists of a spring and a dashpot arranged in a series, represented in the Equation (9) (LI et al., 2010), while the generalized Maxwell model depends on several Maxwell elements in parallel with an independent spring, usually presented as Equation (10) (ANDRES; ZARITZKY; CALIFANO, 2008; BHATTACHARYA, 2010):

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 [E_1 \exp(-t / \lambda_1) + E_e] \quad (9)$$

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 [E_1 \exp(-t / \lambda_1) + E_2 \exp(-t / \lambda_2) + E_e] \quad (10)$$

where ε_0 is the deformation, E_1 and E_2 are the elastic modulus, E_e is the equilibrium elastic modulus, and λ_1 and λ_2 are the relaxation times. Already, the viscous moduli (η_1 and η_2) were obtained from Equation (11), as described by Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero and Cuvelier (2009).

$$\lambda = \eta/E \quad (11)$$

As well as Peleg model, all coefficients and constants from Maxwell and generalized Maxwell models were determined by non-linear regression.

2.8 Microstructural analysis

Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of both cheese samples were obtained using a Jeol JSM 6390 LV scanning electron microscope (Tokyo, Japan), at an accelerating voltage of 8 kV and magnification 100x (100 μm) and 1000x (10 μm). Before using the scanning electron microscope, the samples were frozen in an ultra-

freezer Coldlab® CL129-80V (São Paulo, Brazil) and dried in a liophilizator Terroni LD 3000 (São Carlos, Brazil), and finally mounted on individual stubs with fracture face upwards and coated with a fine gold layer using a Leica EM SCD 500 sputter coater (Wetzlar, Germany).

2.9 Statistical analysis

The data were expressed as means and standard deviation. The significance of the differences between the means of the cheese samples was determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's studentized range (5% significance). The validity of the stress relaxation models was evaluated based on the coefficient of determination (R^2). The data also were submitted to linear correlation (R) from regression analysis. All statistical analyses were performed using the software STATISTICA version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 Results and discussion

3.1 Microbiological analysis

The count of viable probiotic cells in the buffalo Minas Frescal cheese added with bifidobacteria was equal to $8.15 \log \text{CFU g}^{-1}$ (day 1) and $8.36 \log \text{CFU g}^{-1}$ (day 30). Similar results for the count of *Bifidobacterium* BB-12 were verified by Albenzio et al. (2013), Fritzen-Freire et al. (2010a; 2010b) and Scheller and O'Sullivan (2011) in Scamorza ewe milk cheese, Minas Frescal cheese and cheddar cheese, respectively. It is noteworthy that the count of viable probiotic cells obtained in the present work was above the recommended values for a probiotic product. Shah (2011) affirmed that for a product to be considered probiotic, this value should be equal to or greater than $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ of the product. Therefore, the results of the present work indicate that buffalo Minas Frescal cheese could be considered a good vehicle since it favors bifidobacteria maintenance. Boylston et al. (2004) reported that the survival of bifidobacteria is due to the pH and lipid content parameters, which may offer more protection for the probiotic cultures during the storage. However, Aureli et al. (2011) and Salminen, Kenifel and Ouwehand (2011) emphasized that probiotic products should be regularly ingested in order to cause the beneficial health effects and to be able to regularize the intestinal microbial balance.

3.2 Physicochemical analysis

On day 1 and on day 30 of storage, respectively, no differences ($P < 0.05$) were noted between yield, physicochemical composition, pH, acidity and syneresis in either of the buffalo Minas Frescal cheese samples (probiotic and control) (Table 1). However, the yield of both buffalo cheese samples were higher than those observed by Buriti et al. (2005a) and Buriti, Rocha and Saad (2005b) and Fritzen-Freire et al. (2010a; 2010b) for Minas Frescal cheese produced with cow milk. According to Hussain et al. (2012b), this behavior occurs because of the higher contents of protein, lipid and total solids present in buffalo milk.

During storage time, the control and probiotic cheese samples only showed an increase ($P < 0.05$) in their syneresis values. However, these values were lower than those obtained by Fritzen-Freire et al. (2010b) (17.75) and Souza and Saad (2009) (19.60) for probiotic Minas Frescal cheese produced with cow milk. Moreover, Hussain, Bell and Grandison (2011) also noted lower syneresis values for buffalo cheeses, when compared with cow cheeses, showing that the cow cheeses are more liable to lose whey. Sindhu and Arora (2011) reported that this behavior could be credited to the higher content and size of buffalo milk casein micelles. These authors reported that the capacity of κ -casein to stabilize the α -casein during the rennet action is lower in buffalo milk than in other types of milk. In addition, Hussain, Bell and Grandison (2011) described that this lower capacity of κ -casein to stabilize α -casein results in a stronger network, preventing a rearrangement of the curd structure, and thus reducing whey loss over time. It is noteworthy that the storage time did not affect ($P > 0.05$) the other parameters evaluated, neither for the control cheese nor for the probiotic buffalo Minas Frescal cheese.

Storage time and addition of bifidobacteria did not affect ($P < 0.05$) the pH and acidity values. This behavior is favorable to the survival of *Bifidobacterium* BB-12, as reported by Boylston et al. (2004), who stated that the optimum pH would be 6.5 and 7.0, while pH below than 5.0 could be inhibit the stability of this culture in cheeses.

3.3 Color analysis

The color parameters for both buffalo Minas Frescal cheese samples, on day 1 and on day 30 after storage, are also shown in Table 1, while Figure 1 shows the position of the cheese samples in the CIE

L*a*b* colorimetric system. When the color parameters were compared, it was possible to note that the lightness (L^*) and hue angle (h^*) parameters showed no differences ($P < 0.05$) on day 1 nor on day 30 of storage. Contrary to what was reported by Okpala, Piggott and Schaschke (2010) for cow fresh cheese, the control and probiotic buffalo Minas Frescal cheese samples in this present work showed high lightness values throughout all the storage time. According to Sindhu and Arora (2011), this behavior could be attributed to the larger size of the casein micelles and fat globules, and to the absence of carotenoids and the presence of vitamin A in buffalo milk. Furthermore, these authors also stated that the whiter color of buffalo milk has a slight blue-green coloration. For the probiotic cheese samples, the b^* parameter values were different ($P < 0.05$) between day 1 and day 30 of storage while the a^* parameter increased and decreased ($P < 0.05$) in the control cheese and probiotic cheese, respectively. These results are in agreement with those of the study carried out by Sabbagh, Gheisari and Aminlari (2010), who noted a variation in these parameters on Iranian probiotic low-fat white cheese. Gomes and Malcata (1999) and Shah (2011) reported that *Bifidobacterium spp.* may synthesize some nutrients in buffalo milk, such as the B complex vitamins (thiamine, riboflavin and pyridoxine), which are responsible for the slightly green coloration of fresh cheeses and also for the variation in color parameters.

Figure 1: Position of buffalo Minas Frescal cheeses in the CIE L*a*b* colorimetric system: (○) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (●) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (□) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (■) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage.

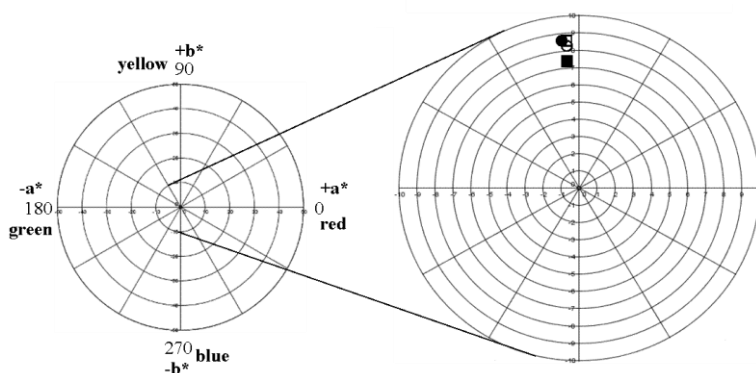


Table 1: Mean values \pm standard deviation of yield, physicochemical composition and color parameters (L^* , a^* , b^* , ΔE^* , C^* , h^*) of the buffalo Minas Frescal cheeses without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and cheeses with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C.

| Analysis | Control | | Probiotic | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Day 1 | Day 30 | Day 1 | Day 30 |
| Yield (g 100 g ⁻¹) | 23.89 ^a \pm 3.64 | - | 24.85 ^a \pm 1.10 | - |
| Total solids (g 100 g ⁻¹) | 41.38 ^{aA} \pm 0.83 | 42.50 ^{aA} \pm 0.53 | 41.79 ^{aA} \pm 0.25 | 43.26 ^{aA} \pm 0.65 |
| Lipid (g 100 g ⁻¹) | 23.24 ^{aA} \pm 0.54 | 23.27 ^{aA} \pm 0.37 | 23.21 ^{aA} \pm 0.24 | 23.77 ^{aA} \pm 0.36 |
| Protein (g 100 g ⁻¹) | 12.00 ^{aA} \pm 0.95 | 12.70 ^{aA} \pm 0.22 | 12.72 ^{aA} \pm 0.71 | 13.32 ^{aA} \pm 0.39 |
| Ash (g 100 g ⁻¹) | 3.07 ^{aA} \pm 0.12 | 3.23 ^{aA} \pm 0.15 | 2.82 ^{aA} \pm 0.21 | 2.53 ^{aA} \pm 0.82 |
| Total Carbohydrates (g 100 g ⁻¹) | 3.16 ^{aA} \pm 0.75 | 3.39 ^{aA} \pm 0.82 | 3.34 ^{aA} \pm 1.22 | 3.67 ^{aA} \pm 0.51 |
| Acidity (% lactic acid) | 0.0266 ^{aA} \pm 0.0004 | 0.0267 ^{aA} \pm 0.0005 | 0.0263 ^{aA} \pm 0.0004 | 0.0270 ^{aA} \pm 0.0003 |
| pH | 7.07 ^{aA} \pm 0.04 | 7.13 ^{aA} \pm 0.02 | 7.09 ^{aA} \pm 0.01 | 7.11 ^{aA} \pm 0.02 |
| Syneresis (g 100 g ⁻¹) | 2.58 ^{aB} \pm 0.09 | 4.66 ^{aA} \pm 0.01 | 2.16 ^{aB} \pm 0.16 | 4.04 ^{aA} \pm 0.05 |
| L^* | 89.14 ^{aA} \pm 0.99 | 89.33 ^{aA} \pm 1.13 | 89.57 ^{aA} \pm 0.78 | 89.66 ^{aA} \pm 0.49 |
| b^* | 8.38 ^{aA} \pm 0.29 | 8.53 ^{aA} \pm 0.60 | 8.23 ^{aA} \pm 0.40 | 7.06 ^{bB} \pm 0.27 |
| a^* | -2.28 ^{aB} \pm 0.13 | -2.47 ^{aA} \pm 0.14 | -2.33 ^{aB} \pm 0.11 | -1.97 ^{bC} \pm 0.13 |
| ΔE^* | - | 0.64 | - | 1.23 |
| C^* | 8.42 ^{aB} \pm 0.28 | 8.88 ^{aA} \pm 0.60 | 8.56 ^{aB} \pm 0.40 | 7.33 ^{bC} \pm 0.29 |
| h^* | 74.12 ^{aA} \pm 0.62 | 73.94 ^{aA} \pm 0.65 | 74.16 ^{aA} \pm 0.75 | 74.19 ^{aA} \pm 0.49 |

^a Within a line, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different studied cheeses for the same period of storage.

^{A-B} Within a line, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different periods of storage for each studied cheese.

The a^* parameter showed correlation ($P < 0.05$) with protein content ($R = -0.526$). As reported by Sindhu and Arora (2011), this fact could be related with biliverdin IX alpha, a blue-green pigment present in buffalo milk that is associated with caseins. However, the b^* and a^* parameters also have high correlation ($P < 0.05$) with the C^* parameter ($R = 0.978$ and $R = -0.995$, respectively). According to Masoud and Jakobsen (2003), this can be explained because the C^* parameter represents color saturation, i.e., it is a combination of the a^* and b^* parameters.

The ΔE^* values of both cheeses showed no differences ($P < 0.05$) in the color of the cheese samples, which is probably attributable to the stability in the L^* parameter during storage. Finally, it was possible to verify that the buffalo Minas Frescal cheese samples showed a greenish white color.

3.4 Rheological analysis

3.4.1 Uniaxial compression

The rheological data of uniaxial compression, rigidity constant (k), and degree of concavity (n) are shown in Table 2. Mancini, Moresi and Rancini (1999) reported that the constant rigidity values of the buffalo Minas Frescal cheese are a measure of stiffness. As required, it was possible to verify that the stiffness of the two buffalo Minas Frescal cheese samples produced in the present work was not affected ($P > 0.05$) by the addition of *Bifidobacterium* BB-12 or by the storage time. As occurred in the studies carried out by Hussain, Bell and Grandison (2011), the high k value obtained for the cheese samples (probiotic and control) indicated that they are stiff, i.e., showed strain-hardening properties, as defined by Roopa and Bhattacharya (2010). Moreover, the buffalo Minas Frescal cheese samples showed high correlation ($P < 0.05$) between the k values and protein ($R = -0.870$), lipid ($R = -0.795$) and ash ($R = 0.959$) contents. This behavior is in agreement with that reported by Wium, Pedersen and Qvist (2003), who noted that the rheological property of cheeses is affected by these contents. In addition, Gwartney, Foegeding and Larick (2002) confirmed that the structural organization of the protein network could also affect the rheological properties.

Table 2

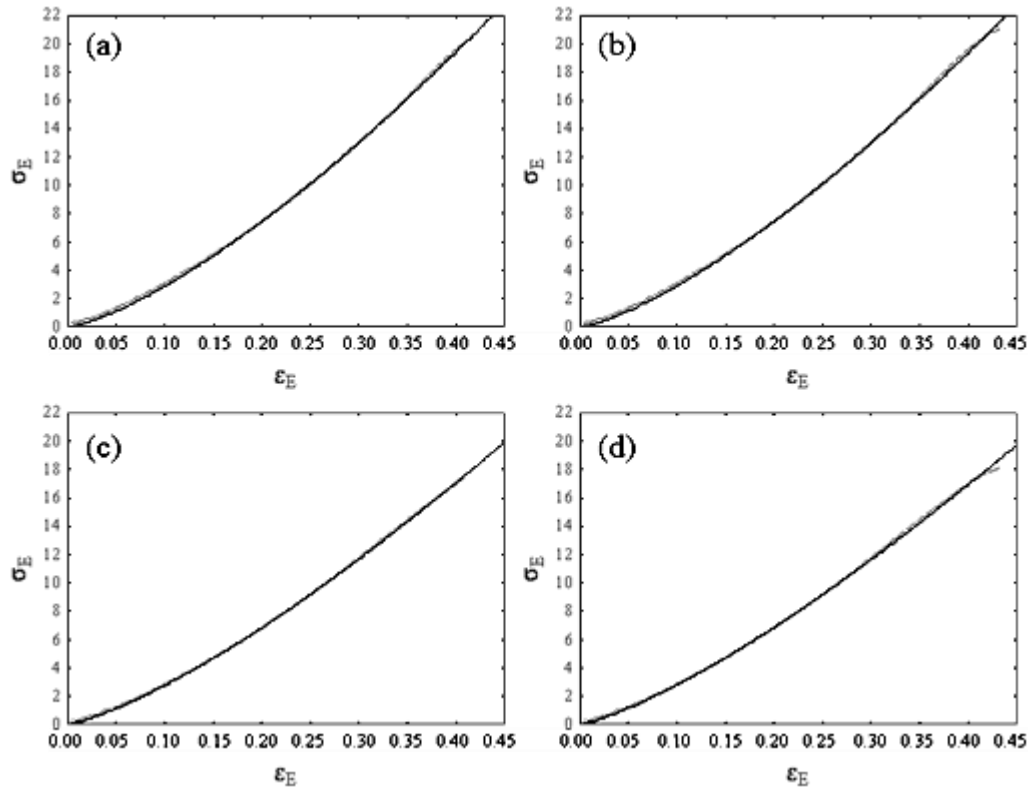
Mean values \pm standard deviation of the compression parameters of the buffalo Minas Frescal cheeses without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and cheeses with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C.

| Cheeses | Days | Rigidity Constant (k) (kPa) | Degree of concavity (n) |
|-----------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| Control | 1 | $61.02^{aA} \pm 4.61$ | $1.30^{aA} \pm 0.05$ |
| | 30 | $60.50^{aA} \pm 4.83$ | $1.31^{aA} \pm 0.04$ |
| Probiotic | 1 | $57.39^{aA} \pm 7.57$ | $1.28^{aA} \pm 0.09$ |
| | 30 | $54.71^{aA} \pm 7.26$ | $1.24^{aA} \pm 0.10$ |

^a Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different studied cheeses for the same period of storage. ^A Within a column, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different periods of storage for each studied cheese.

According to Roopa and Bhattacharya (2010), n shows the power index in the equation relating true stress and strain, while Mancini, Moresi and Rancini (1999) stated that this parameter indicates the deviation from linearity. Therefore, when $n = 1$, the true stress-strain relation becomes Hooke's law while k coincides with the elasticity modulus. Hence, a convex curve is obtained when $n < 1$ while a concave curve is depicted by $n > 1$, i.e., for low compression deformation, when the load is removed the solid returns to its original shape. However, this is not true for larger deformations, where there may occur cell disruption or fractures which irreversibly affect the structure of the solid. During the 30 days of storage of the cheese samples, it was possible to note the positive behavior of the curves (Figure 2), confirming the stiffness observed in the k values. However, the n values showed no differences ($P < 0.05$). Moresi and Bruno (2007) reported that the positive behavior may be attributed to the densification of the structure that occurs during the process of material compression. It was also noted that there is a high correlation between the n values and the protein ($R = -0.771$), lipid ($R = -0.875$) and ash ($R = 0.985$) ($P < 0.05$) content. The data determined by Gwartney, Foegeding and Larick (2002) and Rogers et al. (2009) confirm the results obtained in the present work. Moreover, Hussain, Grandison and Bell (2012a) cited that the cross-linked network is affected by protein and lipid content. These authors described that progressive reduction of the lipid content in cheese generates a higher degree of stiffness. Moreover, Rogers et al. (2010) suggested that the reequilibration of ions could affect all levels of protein structure (from

Figure 2: Compressive engineering stress (σ_E) vs. engineering strain (ϵ_E) for: (a) buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (b) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (c) buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (d) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage.



molecular mass to quaternary structures), and thus alter the array of molecules available to form the gel network and its interactions. These authors also concluded that it is difficult to sort out the individual effects able to alter the stiffness of cheeses. According to Hussain, Bell and Grandison (2011), it is noteworthy that the results verified for cow milk cannot be totally extrapolated to buffalo milk, and probably this explains the differences between their rheological properties. Ahmad et al. (2008) emphasized that the micellar and physicochemical changes in buffalo milk and in cow milk appear to be qualitatively similar but quantitatively different.

3.4.2 Stress relaxation

The Peleg, Maxwell and generalized Maxwell models were fitted to the probiotic and control buffalo Minas Frescal cheese samples on day 1 of storage; their curves are shown in Figure 3. It was possible to note that the Peleg model ($R^2 < 0.95$) overestimates the initial decay of the force and does not adjust satisfactorily the intermediate data, between 8 and 28 s. In addition, the Maxwell model ($R^2 < 0.96$) underestimates the initial stress decay and the values between 4 and 12 s overestimate the stress. On the other hand, the generalized Maxwell model fitted satisfactorily to the experimental data ($R^2 > 0.99$) and adequately adjusted the initial stress decay as well as the end stress values. Thereby, the generalized Maxwell model was found to be suitable in this work to evaluate the rheological behavior of the buffalo Minas Frescal cheese samples. This result is in agreement with Steffe (1992), who reported that the viscoelastic behavior of food can be better described through generalized Maxwell model, because it considers the equilibrium stress. The same was also observed by Bertola et al. (2000), Cunha, Viotto and Viotto (2006) and Hort and Le Grys (2001), for Gouda, Minas Frescal, and Cheddar cheese, respectively. These authors concluded that the relaxation curves were best described by two Maxwellian elements in parallel with one pure elastic residual element, as proposed by the generalized Maxwell model.

The stress-relaxation parameters of the generalized Maxwell model, such as elastic moduli (E_1 and E_2); equilibrium elastic modulus (E_e); and viscous moduli (η_1 and η_2); for the buffalo cheese samples during storage time, are shown in Table 3. Through those results it was verified that the addition of *Bifidobacterium* BB-12 did not influence ($P < 0.05$) on the rheological properties of either of the buffalo cheese

Figure 3: Typical experimental stress relaxation curves and values fitted with: (a) Maxwell model ($R^2 < 0.96$); (b) Generalized Maxwell model ($R^2 > 0.99$); and (c) Peleg model ($R^2 < 0.95$) for the buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic).

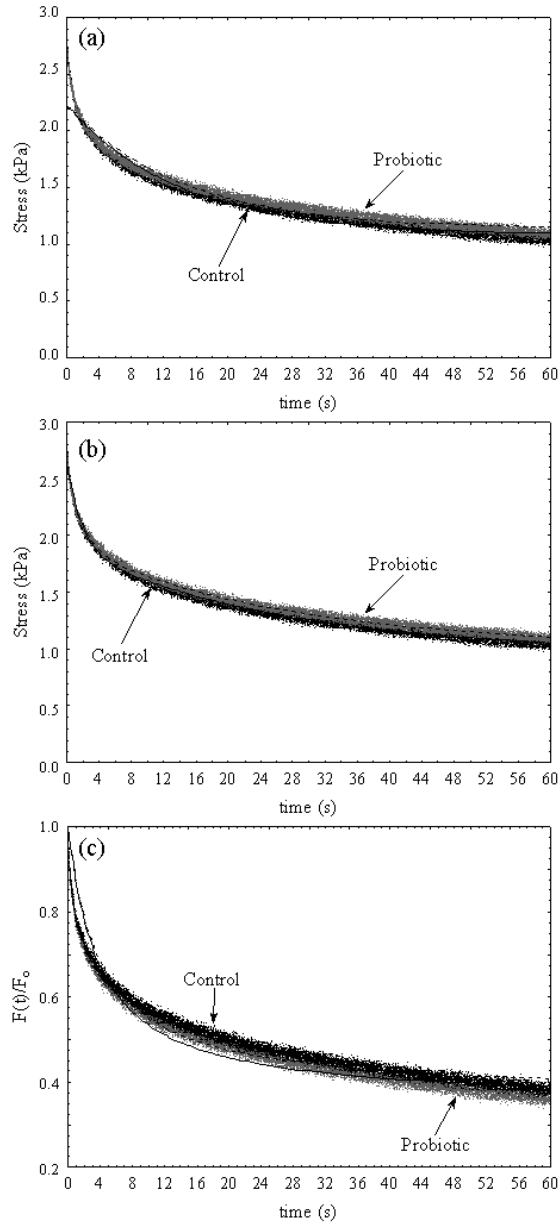


Table 3

Mean values \pm standard deviation of the generalized Maxwell model stress-relaxation parameters for the buffalo Minas Frescal cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 and 30 days after storage at 5 ± 1 °C.

| Parameters | Control | | Probiotic | |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | Day 1 | Day 30 | Day 1 | Day 30 |
| Elastic modulus (E_1) (kPa) | $7.19^{aA} \pm 1.51$ | $6.41^{aA} \pm 0.89$ | $6.69^{aA} \pm 0.86$ | $6.30^{aA} \pm 1.27$ |
| Elastic modulus (E_2) (kPa) | $8.32^{aA} \pm 1.32$ | $5.97^{aA} \pm 1.24$ | $8.46^{aA} \pm 1.18$ | $7.58^{aA} \pm 2.33$ |
| Equilibrium elastic modulus (E_e) (kPa) | $8.89^{aA} \pm 1.71$ | $9.08^{aA} \pm 1.17$ | $9.59^{aA} \pm 1.47$ | $9.59^{aA} \pm 2.53$ |
| Viscous modulus (η_1)(kPa.s) | $12.57^{aA} \pm 3.05$ | $11.55^{aA} \pm 1.79$ | $12.00^{aA} \pm 2.09$ | $10.56^{aA} \pm 1.96$ |
| Viscous modulus (η_2)(kPa.s) | $105.49^{aA} \pm 33.66$ | $67.58^{aA} \pm 10.34$ | $103.36^{aA} \pm 31.64$ | $82.63^{aA} \pm 41.01$ |

^a Within a line, different superscript lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different studied cheeses for the same period of storage.

^A Within a line, different superscript uppercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) among the different periods of storage for each studied cheese.

samples. No alterations ($P < 0.05$) were observed in the other parameters of the generalized Maxwell model. According to Cunha, Viotto and Viotto (2006), this result was expected because Minas Frescal is a fresh cheese, where perceptible rheological changes are not expected to occur during a short shelf life.

During the storage time of both cheese samples, the elastic moduli showed correlation ($P < 0.05$) with the contents of protein, total solids and lipid. Thus, the E_e was also affected by these parameters. However, a higher correlation ($P < 0.05$) was verified with the protein content ($R = 0.814$). This fact is in accordance with Guinee (2011), who noted that when the concentration of casein in the matrix increases, the intra- and inter-strand linkages become more numerous and the matrix per se displays more elasticity, and thus become more difficult to deform. Moreover, Hinrichs (2001) stated that the high amounts of caseins available for interactions and the formation of coarser gels result in stiffer and more elastic cheeses, confirming the behavior observed in the uniaxial compression tests. The results obtained in this present work still suggest that the strong intermolecular attractions are responsible for the elasticity of the casein matrix, as reported by Cunha, Viotto and Viotto (2006). Besides, according to Fox et al. (2000) and Guinee (2011), when there are higher contents of total solids and lipid, the cheese becomes more elastic once its moisture content acts as a plasticizer in the protein matrix and its fat globules limit the deformation.

The elastic moduli also showed high correlation ($P < 0.05$) ($R > -0.887$) with pH values (Table 1) of cheese. As verified by Guinee (2011), the effect of pH on the rheological properties of cheese probably ensues from its influence on the ratio of soluble to colloidal calcium, on the degree of paracasein hydration, and/or on the types of intra- and inter-aggregate bonds.

The viscous moduli during the storage time of the buffalo cheese samples showed correlation ($P < 0.05$) with the contents of protein ($R > -0.519$) and total solids ($R > -0.731$). These results are in agreement with those reported by Dimitreli and Thomareis (2007), who stated that the total solid content disturbs the coherence of three-dimensional matrix increasing its strength while proteins lead to the formation of a denser network structure, which is correlated with the rheological parameters. According to Fox et al. (2000), the greater the viscosity, the greater the stress required to deform the material and hence the stiffer the cheese. The same was concluded by Bertola et al.

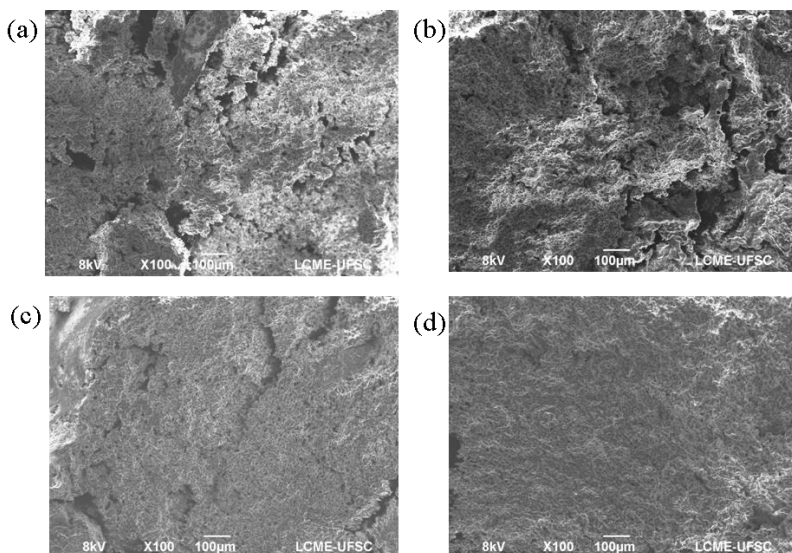
(2000), who reported that high viscosity and high elastic modulus correspond to stiffer cheeses, confirming the role of the elastic moduli.

Finally, it was possible to verify that the rheological behavior of the buffalo Minas Frescal cheese samples (control and probiotic) on days 1 and 30 of storage is viscoelastic. This means that these materials show properties of both solid (elastic behavior) and fluid (viscous behavior). However, in this present work the data obtained from the uniaxial compression and stress relaxation tests indicated that the cheese samples show a tendency to be more elastic than viscous.

3.5 Microstructural analysis

Figure 4 (a, b, c, and d) shows the micrographs of the buffalo Minas Frescal cheese samples (control and probiotic) on days 1 and 30 of storage.

Figure 4: SEM micrographs of buffalo Minas Frescal cheese: (a) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (c) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 1 of storage; and (b) cheese without *Bifidobacterium* BB-12 (control) and (d) cheese with *Bifidobacterium* BB-12 (probiotic), on day 30 of storage.



As no differences were observed for the solid contents of both cheese samples, it is possible to conclude that the storage time reduced the rate of whey expulsion. Therefore, the moisture originally present within the lipid-whey channels was absorbed into the protein matrix, resulting in a well hydrated protein. During the short storage time of cheese, Morales-Celaya et al. (2012) also observed that the channels between casein strands tended to lose definition and, therefore, adjacent casein strands were very close to each other, and thus generated a more compact and homogeneous overall structure.

It is known that the microstructure of cheese is one of the major controlling factors of its rheological properties. At least with the results obtained in the present work, it was possible to note that image analysis is a powerful tool to evaluate network structures, analyzing changes in microstructural properties and showing subtle differences in aggregates of both buffalo Minas Frescal cheese samples during the storage time.

4 Conclusions

Buffalo Minas Frescal cheese added with *Bifidobacterium* BB-12 showed a great potential as a functional food. After 30 days of storage, the cheese samples showed an increase in the syneresis values, while the other physicochemical parameters remained unaltered. After the same time of storage of the probiotic cheese, the color parameters b^* and a^* decreased. The generalized Maxwell model fits the experimental data better than the Maxwell and the Peleg models. The addition of bifidobacteria and the storage time of the buffalo Minas Frescal cheese samples did not affect their rheological properties. These properties indicated a tendency to obtain stiff and elastic cheeses. Therefore, both buffalo cheese samples showed a tendency to be more elastic than viscous, where the storage time of 30 days resulted in a cheese with a more closed structure.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. The authors also gratefully thank to the Cryovac®, for provide the plastic bags; and the Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC), especially to research supported by LCME-UFSC, such as scanning electron microscopy (SEM).

References

AHMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J. F.; GAUCHERONA, F. Effects of acidification on physicochemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemistry**, v. 106, p. 11-17, 2008.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; BRAGHIERI, A.; SEVI, A.; NAPOLITANO, F. Composition and sensory profiling of probiotic Scamorza ewe milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2792-2800, 2013.

ANDRÉS, S. C.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Stress relaxation characteristics of low-fat chicken sausages made in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 589-594, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**, 18th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA, 2005.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366-376, 2011.

BERTOLA, N. C.; CALIFANO, A. N.; BEVILACQUA, A. E.; ZARITZKY, N. E. Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 207-214, 2000.

BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 539-546, 2010.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375-387, 2004.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 173-180, 2005a.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005b.

CALVO, M. V.; CASTILLO, I.; DÍAZ-BARCOS, V.; REQUENA, T.; FONTECHA, J. Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. **Food Chemistry**, v. 102, p. 917-924, 2007.

CHEN, L.; OPARA, U. L. Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 497-507, 2013.

CUNHA, C. R.; VIOTTO, W. H.; VIOTTO, L. A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 215-224, 2006.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1364-1373, 2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). **Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. FAO Food and Nutritional Paper No. 85. (ISBN 92-5-105513-0), 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA. 2000. 587p.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 561-568, 2010a.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of *Bifidobacterium* BB-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621-627, 2010b.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GUINEE, T. P. Cheese rheology. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 685-697.

GWARTNEY, E. A.; FOEGEDING, E. A.; LARICK, D. K. The texture of commercial full-fat and reduced-fat cheese. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 812-816, 2002.

HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, v.11, p. 495-503, 2001.

HORT, J.; LE GRYS, G. Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 475-481, 2001.

HUSSAIN, I.; BELL, A. E.; GRANDISON, A. S. Comparison of the rheology of mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. **Food Chemistry**, v. 128, p. 500-504, 2011.

HUSSAIN, I.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 1: Rheology and microstructure. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1500-1508, 2012a.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 2: Curd yield, overall quality and casein fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1404-1410, 2012b.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**, 4th ed. IAL, São Paulo, Brasil, 2005.

LI, Q.; LI, D.; WANG, L. J.; OZKAN, N.; MAO, Z. H. Dynamic viscoelastic properties of sweet potato studied by dynamic mechanical analyzer. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 520-525, 2010.

LOBATO-CALLEROS, C.; REYES-HERNÁNDEZ, J.; BERISTAIN, C. I.; HORNELAS-URIBE, Y.; SÁNCHEZ-GARCÍA, J. E.; VERNON-CARTER, E. J. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. **Food Research International**, v. 40, p. 529-537, 2007.

MANCINI, M.; MORESI, M.; RANCINI, R. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 369-378, 1999.

MASOUD, W.; JAKOBSEN, M. Surface ripened cheeses: The effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 231-237, 2003.

MESSENS, W.; VAN DEWALLE, D.; AREVALO, J.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 359-367, 2000.

MORALES-CELAYA, M. F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 132-141, 2012.

MORESI, M.; BRUNO, M. Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 298-309, 2007.

OKPALA, C.; PIGGOTT, J.; SCHASCHKE, C. Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 61-67, 2010.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446-456, 2006.

PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. **Journal of Rheology**, v. 24, p. 451-463, 1980.

PELEG, M.; CAMPANELLA, O. H. The mechanical sensitivity of soft compressible testing machines. **Journal of Rheology**, v. 33, p. 455-467, 1989.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 202-206, 2009.

ROGERS, N. R.; DRAKE, M. A.; DAUBERT, C. R.; MCMAHON, D. J.; BLETSCH, T. K. FOEGEDING., E. A. The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4756-4772, 2009.

ROGERS, N. R.; MCMAHON, D. J.; DAUBERT, C. R.; BERRY, T. K.; FOEGEDING, E. A. Rheological properties and microstructure of

Cheddar cheese made with different fat contents. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4565-4576, 2010.

ROOPA, B. S.; BHATTACHARYA, S. Texturized alginate gels: Screening experiments to identify the important variables on gel formation and their properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1403-1408, 2010.

SABBAGH, N.; GHEISARI, H. R.; AMINLARI, M. Monitoring the chemical and microbiological changes during ripening of Iranian probiotic low-fat white cheese. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, p. 249-257, 2010.

SALMINEN, S.; KENIFEL, W.; OUWEHAND, A. C. Probiotics, Applications in Dairy Products. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 503-511.

SCHELLER, M.; O'SULLIVAN, D. J. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies lactis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1122-1131, 2011.

SHAH, N. P. *Bifidobacterium* spp.: Applications in Fermented Milks, In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 685-697.

SINDHU, J. S.; ARORA, S. Buffalo Milk, In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 503-511.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 633-640, 2009.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Freeman Press, East Lansing, MI, USA.1992. 418p.

TUNICK, M. H.; MACKEY, K. L.; SHIEH, J. J.; SMITH, P. W.; COOKE, P.; MALIN, E. L. Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, v. 3, p. 649-662, 1993.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

WIUM, H.; PEDERSEN, P. S.; QVIST, K. B. Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties of fat-free Feta cheese made from ultrafiltered milk. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 287-296, 2003.

Capítulo 3

**O queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala como matriz
protetora de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais
simuladas *in vitro***

* Artigo a ser submetido e em revisão no *LWT- Food Science and Technology* (ISSN: 0023-6438)

O queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala como matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

Resumo

O queijo tipo Minas Frescal e o caldo MRS (controle) adicionados de *Bifidobacterium* BB-12 foram submetidos às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Ambas as amostras foram submetidas sequencialmente às condições encontradas na boca, no esôfago-estômago, no duodeno e no íleo humano. No final de cada etapa, foi realizada a contagem de células viáveis e a taxa de sobrevivência de bifidobactérias. Após cada etapa da simulação, as contagens das células viáveis de bifidobactérias permaneceram acima do recomendado para um produto probiótico ($<6 \log \text{UFC g}^{-1}$), tanto para o queijo do leite de búfala como para o caldo MRS. O efeito protetor do queijo do leite de búfala foi observado nas condições gastrointestinais simuladas, inclusive quanto à recuperação das células injuriadas de bifidobactérias, como foi verificado após a etapa do duodeno. Desta forma, o queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala apresentou efeito protetor para *Bifidobacterium* BB-12 durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, sendo um promissor carreador deste probiótico.

Palavras-chave: Queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala; leite de búfala; *Bifidobacterium* BB-12; queijo probiótico; probióticos; simulação gastrointestinal *in vitro*.

Abstract

Buffalo Minas Frescal cheese with *Bifidobacterium* BB-12 and MRS broth, as a control, were subjected to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. Both samples were subjected to the typical conditions in the human mouth, esophagus-stomach, duodenum and ileum, sequentially. At the end of each step, the count of viable bifidobacteria cells and their survival rate were investigated. After each step of the simulated gastrointestinal conditions, the count of viable bifidobacteria cells was above the recommended for a probiotic product, for both the buffalo

cheese and the MRS broth. A protective effect of buffalo cheese was noted in the simulated gastrointestinal conditions, including the recovery of the damaged bifidobacteria cells, as verified after the duodenum simulation step. Thus, buffalo Minas Frescal cheese appeared to protect *Bifidobacterium* BB-12 during *in vitro* simulated gastrointestinal conditions, thereby making it a promising carrier of this probiotic bacterium.

Keywords: Buffalo Minas Frescal cheese; buffalo milk; *Bifidobacterium* BB-12; probiotic cheese; probiotic; *in vitro* simulated gastrointestinal conditions.

1 Introdução

O leite de búfala é normalmente empregado na fabricação de produtos lácteos em escala comercial, além disso, durante os últimos anos ele vem se tornando popular no Brasil e em outros países ao redor do mundo (HUSSAIN et al., 2012). Um dos produtos que podem ser elaborados a partir desse leite é o queijo tipo Minas Frescal. O queijo Minas Frescal é conhecido por ser uma das variedades de queijo mais consumidas no Brasil, além de ser um queijo fresco que apresenta características como coloração esbranquiçada, sabor levemente ácido e salgado (CUNHA; VIOTTO; VIOTTO, 2006). É produzido por coagulação enzimática de leite pasteurizado (BURITI et al., 2005a). Por causa das suas características o queijo Minas Frescal pode servir como um bom carreador para bactérias probióticas (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005b).

Probióticos são microrganismos viáveis que quando administrados continuamente e em quantidades adequadas são benéficos para a saúde de quem os consome (FAO/WHO, 2006). No entanto, para que um produto seja considerado probiótico a contagem de células viáveis deve ser igual ou superior a $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ (SHAH, 2011). Além disso, de acordo com Gomes, Vieira e Malcata (1998), o uso de uma bactéria probiótica como um componente em derivados lácteos pode ser justificado se a viabilidade e a atividade no alimento carreador puderem ser asseguradas até o momento do consumo ou final da validade. Por outro lado, Naidu, Bidlack e Clemens (1999) afirmam que os microrganismos probióticos devem também sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal (boca, esôfago, estômago, intestino delgado e íleo)

para exercerem efetivamente os benefícios a saúde do consumidor. Entre os gêneros mais utilizados estão o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, este último se destaca por ser um dos gêneros de probióticos mais utilizados na aplicação em derivados lácteos (SCHELLER; O'SULLIVAN, 2011).

Considerando que produtos adicionados de microrganismos probióticos apresentam conhecidas propriedades benéficas a saúde, torna-se necessário avaliar a sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 após o processo de digestão gastrointestinal. Nesse sentido, Failla e Chitchumroonchokchai (2005) reportaram que metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas como uma alternativa mais simples e rápida aos ensaios *in vivo*, uma vez que estes são estudos demorados e mais caros, além de apresentarem alta variabilidade entre os indivíduos. Alguns estudos realizaram a simulação das condições gastrointestinais *in vitro* com alimentos estruturados com adição de probióticos, porém não de forma contínua como naturalmente ocorre durante o processo de digestão (ABADÍA-GARCÍA et al., 2013; MAKELAINEN et al., 2009; ORTAKCI et al., 2012; SOLIERI et al., 2014). No entanto, as condições gastrointestinais simuladas utilizadas nesse trabalho incluíram todas as partes do sistema gastrointestinal, ou seja, boca (com simulação da saliva), esôfago-estômago (com diminuição gradual do pH e adição de pepsina), duodeno (aumento do pH, adição de sais de bile e pancreatina) e íleo (aumento do pH). Além disso, foi realizada a simulação mecânica dos movimentos peristálticos em todas as fases e uma diminuição gradual do pH na fase do estômago (como normalmente ocorre durante a digestão) como sugerido por Madureira et al. (2011).

Embora alguns estudos tenham testado o comportamento de várias culturas probióticas na produção de queijos frescos a partir de leite de vaca (BURITI et al., 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2010; SOUZA; SAAD, 2009), estudos com queijos frescos adicionados de bactérias probióticas feitos a partir de leite de búfala são escassos. Desta forma, a utilização de leite de búfala na produção de um queijo tipo Minas Frescal probiótico representa uma alternativa interessante para a valorização da matéria-prima, além de apresentar ao consumidor mais uma alternativa de produto probiótico.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor de queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala sobre a contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 quando submetido as condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

2 Material e métodos

2.1 Material

O material usado foi leite de búfala pasteurizado com conteúdo de sólidos totais de 16,60 g 100 mL⁻¹, lipídeos de 5,66 g 100 mL⁻¹, proteína de 4,37 g 100 mL⁻¹, cinzas de 1,09 g 100 mL⁻¹ e carboidratos de 5,47 g 100 mL⁻¹. Além disso, foram utilizados cloreto de cálcio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), cultura probiótica de *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], cultura probiótica - Probiótico-Tec[®], cultura liofilizada para inoculação direta - DVS, CHR Hansen, Hónsholm, Dinamarca), ácido láctico (Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brasil) e coalho comercial com quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* (com razão de 1:3000, Ha La[®], CHR Hansen, Valinhos, Brasil). As enzimas α -amilase (28,75 U mg⁻¹ de proteína), pepsina da mucosa gástrica suína (400 U mg⁻¹ de proteína) e pancreatina de pâncreas suíno (poder digestivo - 8 x USP); e os sais biliares de bovinos utilizado para as condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para determinar a contagem de células viáveis de bifidobactérias foram utilizados caldo MRS (Difco, Faísca, EUA), MRS agar (Difco, Faísca, EUA), propionato de sódio (Fluka, Neu-Ulm, Alemanha), cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e AnaeroGen[®] (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). Todos os reagentes químicos utilizados eram de grau analítico.

2.2 Fabricação do queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala

Duas formulações de queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala (com e sem adição de bactérias probióticas) foram elaborados para a utilização no ensaio das condições gastrointestinais simuladas seguindo o procedimento descrito por Souza e Saad (2009), com modificações. O queijo com bactérias probióticas foi produzido a partir de leite de búfala pasteurizado aquecido a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, adicionado de ácido láctico (0,25 mL L⁻¹ de uma solução de ácido láctico 85%) e coalho comercial à razão de 1:3000 (0,9 mL L⁻¹ de leite). O cloreto de cálcio (0,4 mL L⁻¹ de uma solução a 40% de cloreto de cálcio) e a cultura probiótica (0,15 g L⁻¹ de leite de búfala) foram adicionados ao leite, seguido por incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 40 minutos. O gel resultante foi cortado em cubos, deixado o soro aflorar e a massa colocada em

embalagens cilíndricas perfuradas, cada uma com capacidade para 500 g. Para uma melhor drenagem os queijos foram mantidos sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ \text{C}$) durante a noite. Depois, os queijos foram salgados em salmoura (200 g L^{-1} de cloreto de sódio) a $5 \pm 1^\circ \text{C}$ por 1 hora e embalados a vácuo em sacos plásticos Cryovac® (BN 200, São Paulo, Brasil). A elaboração do queijo sem bactérias probióticas seguiu os mesmos procedimentos, mas as bifidobactérias não foram adicionadas. Por fim, os queijos foram armazenados à temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ \text{C}$) até a realização das análises.

2.3 Sobrevivência das bifidobactérias em condições gastrointestinais simuladas

2.3.1 Preparação das amostras de queijo

Os queijos tipo Minas Frescal do leite de búfala (com e sem adição de bactérias probióticas) foram divididos em frações de 25 gramas e distribuídos em frascos estéreis. As amostras de queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala usadas no ensaio das condições gastrointestinais simuladas foram divididas como se segue: C1 é a amostra de queijo sem bifidobactérias, mas exposto às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, ou seja, usado somente para os ajustes de pH; C2 é a amostra de queijo com as bifidobactérias, mas não exposto às condições gastrointestinais simuladas (controle); e C3 é a amostra de queijo com as bifidobactérias e expostos às condições gastrointestinais simuladas. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

2.3.2 Preparação do caldo MRS para ser usado como controle

O caldo MRS foi utilizado como um controle, de acordo com o recomendado por Madureira et al. (2011). É importante salientar que o comportamento da cepa probiótica no caldo MRS proporciona uma boa base para comparação, permitindo avaliar o efeito protetor da matriz de queijo sobre os probióticos (Madureira et al., 2011).

O caldo MRS foi modificado com a adição de 0,2% de cloreto de lítio e 0,3% de propionato de sódio, tal como recomendado por Vinderola e Reinheimer (2000), uma vez que apenas as bifidobactérias são capazes de crescer sob essas condições, além de suas células

apresentarem uma melhor recuperação nesse meio. Assim como para as amostras de queijo, o caldo MRS foi dividido em frações de 25 mL e distribuído em frascos estéreis. Para o ensaio das condições gastrointestinais simuladas, as amostras de caldo MRS foram divididas como a seguir: B1 é a amostra de caldo sem bifidobactérias, mas exposto às condições gastrointestinais simuladas, ou seja, usado somente para os ajustes de pH; B2 representa a amostra de caldo inoculado com bifidobactérias ($0,10 \text{ g L}^{-1}$ de caldo MRS incubadas durante 48 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$), mas não expostos às condições gastrointestinais simuladas (controle); e B3 representa a amostra de caldo inoculado com as bifidobactérias ($0,10 \text{ g L}^{-1}$ de caldo MRS incubadas durante 48 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$) e exposta às condições gastrointestinais simuladas. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

2.3.3 Condições Gastrointestinais Simuladas

As condições gastrointestinais simuladas foram realizadas nas amostras C1, C3, B1 e B3 e seguiram o protocolo estabelecido por Laurent, Besançon e Caporiccio (2007) e Madureira et al. (2011), com algumas modificações. Este protocolo simula sequencialmente as condições típicas predominantes da boca, esôfago-estômago, duodeno e íleo humano. Os parâmetros estabelecidos para simular essas condições (soluções de enzimas, os valores de pH, o período de tempo e intensidades de agitação em cada compartimento digestivo) estão descritos na Tabela 1. As soluções de enzimas foram preparadas e esterilizadas com filtro de membrana de 0,22 micrometros (MF-Millipore, Billerica, MA, EUA) nos dias das análises; após a esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação.

Para simular a temperatura e a intensidade de movimentos peristálticos em cada etapa do sistema digestivo do organismo humano foi usado um banho maria (Dist DI950M, Florianópolis, SC, Brasil), mantido a $37 \pm 1^\circ\text{C}$; a agitação mecânica foi utilizada com intensidades semelhantes às aquelas alcançadas em cada etapa do sistema digestivo. Para a etapa de simulação da mastigação (boca), o pH foi ajustado para 6,9 com NaHCO_3 1M e uma solução de saliva preparada com 100 U mL^{-1} de α -amilase e CaCl_2 1 mM foi adicionada as amostras a uma taxa de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante 2 min (Laurent et al., 2007; Madureira et al., 2011), com agitação de 200 rpm (Choi et al., 2007). Na etapa do esôfago-estômago o pH das amostras foi diminuído gradualmente até 2

Tabela 1

Parâmetros usados em cada etapa das condições gastrointestinais simuladas (Adaptado de Madureira et al., 2011, com modificações).

| Etapa | Condições Simuladas | Agitação (rpm) | pH Final | Tempo (min) |
|--------------------|---|----------------|----------|-------------|
| Boca | α -amilase + CaCl_2 | 200 | 6.9 | 2 |
| Esôfago – Estômago | Pepsina + HCl | 130 | 5.5 | 10 |
| | | | 4.6 | 10 |
| | | | 3.8 | 10 |
| | | | 2.8 | 20 |
| | | | 2.3 | 20 |
| | | | 2.0 | 20 |
| Duodeno | Pancreatina + sais de bile + NaHCO_3 | 45 | 5.0 | 20 |
| Íleo | NaHCO_3 | 45 | 6.5 | 90 |

utilizando HCl 1M enquanto 0,05 ml de solução de pepsina (25 mg mL⁻¹ em HCl 0,1 M) foi adicionado por grama da amostra. Esta solução foi adicionada em alíquotas de igual proporção durante toda a fase gástrica, num total de 90 min a 130 rpm de agitação. Já para simular a etapa do duodeno a acidez foi aumentada até o pH 5 pela adição de NaHCO₃ 1M. Em seguida, 0,25 mL de solução de sais biliares e pancreatina (2 g L⁻¹ de pancreatina e 12 g L⁻¹ de sais de bile bovino em NaHCO₃ 0,1M) foi adicionado no início desta etapa por grama de amostra. Nesta etapa, foi empregada uma agitação igual a 45 rpm durante 20 min. Por fim, para a etapa do íleo, o pH foi aumentado para 6,5 com a adição de NaHCO₃ 1M, e a agitação foi mantida a 45 rpm durante 90 min.

2.4 Análises Microbiológicas

No final de cada etapa da simulação gastrointestinal foram realizadas as contagens de células viáveis de bifidobactérias nas amostras C2, C3, B2 e B3. Para isto, a diluição de cada amostra foi corrigida até a proporção de 25g de queijo ou 25 ml de caldo MRS para 225 mL de água peptonada (0,1 g 100g⁻¹). As condições gastrointestinais simuladas foram conduzidas de maneira contínua, de modo que o volume global de trabalho aumentou, assim como acontece naturalmente durante o processo de digestão. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em Bag Mixer 400 (Interscience, St. Nom, França), diluídas em série com água peptonada (0,1 g 100g⁻¹) e plaqueadas em profundidade com ágar MRS modificado com a adição de cloreto de lítio (0,2%) e propionato de sódio (0,3%), de acordo com Vinderola e Reinheimer (2000). As placas foram incubadas em jarras anaeróbias contendo AnaeroGen[®] a 37 ± 1°C durante 72 h. Após o período de incubação, a contagem de células viáveis de bifidobactérias foi realizada e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (log UFC g⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.1 Taxa de sobrevivência das bifidobactérias

A taxa de sobrevivência das bifidobactérias após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas foi calculada através da equação 1, de acordo com Guo et al. (2009).

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = (\log \text{UFC } N_1 / \log \text{CFU } N_0) \times 100 \quad (1)$$

onde N_1 representa a contagem total de bifidobactérias viáveis depois da exposição a cada etapa das condições gastrointestinais simuladas e N_0 representa a contagem inicial de células viáveis das bifidobactérias antes da exposição a cada etapa.

2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foi utilizada para determinar as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os resultados. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

3 Resultados e discussão

A Figura 1 e a Tabela 2 apresentam os resultados das contagens de células viáveis de bifidobactérias e as taxas de sobrevivência de bifidobactérias após cada etapa da simulação gastrointestinal das amostras C2, C3, B2 e B3. Foi possível observar que no início das condições gastrointestinais simuladas a contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 nos queijos tipo Minas Frescal foi igual a 8,47 log UFC g⁻¹, enquanto que no caldo MRS foi igual a 9,01 log UFC g⁻¹. Shah (2011) relata que, para um produto ser considerado probiótico, a contagem deve ser igual ou superior a 6 log UFC g⁻¹ de produto. Desta maneira, as contagens iniciais de células viáveis de bifidobactérias neste estudo estão de acordo com os valores mínimos recomendados para um produto probiótico. Aureli et al. (2011) e Salminen, Kenifel e Ouwehand (2011) sugerem que a fim de se obter os efeitos benéficos para a saúde, a ingestão diária deve ser de 100 g de produto que apresente uma contagem de células viáveis de 8-9 log UFC g⁻¹. Além disso, verificou-se que as bifidobactérias mantiveram suas contagens de células viáveis e as taxas de sobrevivência nos controles das amostras do queijo (C2) e do caldo MRS (B2) durante todas as etapas das condições gastrointestinais simuladas.

Figura 1: Contagem de células viáveis (média \pm desvio padrão) de *Bifidobacterium* BB-12, após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas para: (a) C2 - amostra de queijo não exposto às condições gastrointestinais simuladas (\square) e C3 - amostra de queijo exposto às condições gastrointestinais simuladas (\blacksquare); e (b) B2 - caldo MRS não exposto às condições gastrointestinais simuladas (\square) e B3 - caldo MRS exposto às condições gastrointestinais simuladas (\blacksquare).

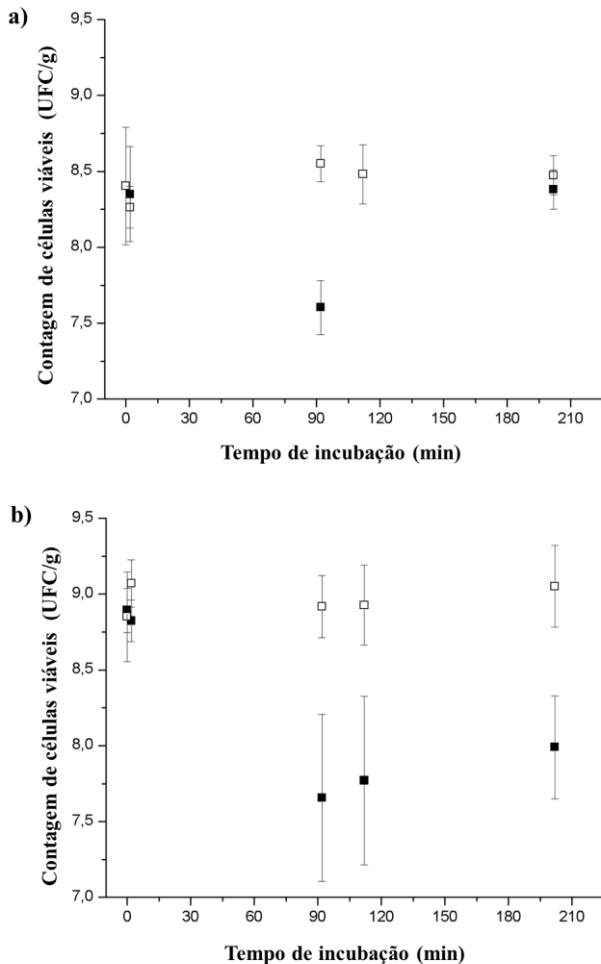


Tabela 2

Taxa de sobrevivência (%) de *Bifidobacterium* BB-12 no queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala e no caldo MRS após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas.

| Etapas | Caldo MRS | | Queijo Probiótico | |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | B2 | B3 | C2 | C3 |
| Inicial | - | - | - | - |
| Boca | 102.52 ^{aA} ± 1.71 | 99.22 ^{aBC} ± 1.35 | 98.49 ^{aA} ± 5.32 | 102.99 ^{abAB} ± 4.75 |
| Esôfago- Estômago | 98.31 ^{aA} ± 1.23 | 86.78 ^{bD} ± 6.27 | 103.47 ^{aA} ± 0.41 | 91.10 ^{cCD} ± 2.04 |
| Duodeno | 100.16 ^{aA} ± 4.26 | 93.42 ^{abBCD} ± 0.60 | 99.21 ^{aA} ± 3.37 | 109.55 ^{aA} ± 2.39 |
| Íleo | 101.38 ^{aA} ± 1.01 | 100.32 ^{aABC} ± 2.97 | 99.98 ^{aA} ± 3.75 | 100.64 ^{bB} ± 1.32 |

^{a-c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) entre as diferentes etapas das condições gastrointestinais simuladas para cada amostra.

^{A-B} Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) entre as diferentes etapas das condições gastrointestinais simuladas para cada tratamento.

B2: amostra de caldo MRS com bifidobactéria, mas não exposto às condições gastrointestinais simuladas.

B3: amostra de caldo MRS com bifidobactérias e exposto às condições gastrointestinais simuladas.

C2: amostra de queijo com bifidobactéria, mas não exposto às condições gastrointestinais simuladas.

C3: amostra de queijo com bifidobactérias

A primeira etapa das condições gastrointestinais simuladas foi a boca, uma vez que a enzima α -amilase está presente em grandes quantidades na saliva humana e de uma forma gradual, começa o processo de digestão dos alimentos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Após a exposição a estas condições foi possível notar que a contagem de células viáveis e a taxa de sobrevivência de bifidobactérias das amostras B3 e C3 não foram afetadas ($P < 0,05$). Todavia, a amostra C3 exibiu um efeito protetor sobre as bifidobactérias, uma vez que não foi detectada nenhuma redução nas suas contagens de células viáveis. Isso se deve em parte a ausência de relatos na literatura de atividade inibitória de α -amilase frente à *Bifidobacterium* BB-12 em específico. Além disso, Boylston et al. (2004) relataram que 5,0-7,0 é o intervalo ótimo de pH para o crescimento de bifidobactérias (o pH alcançado nessa etapa foi de 6,9). Provavelmente, o pouco tempo de contato com a enzima e também a capacidade tampão do bicarbonato de sódio presente na solução contribuiu para manter as bactérias mais estáveis durante a passagem pela etapa da boca.

Na etapa seguinte, quando as amostras C3 e B3 foram expostas às condições gastrointestinais simuladas do esôfago-estômago as contagens de células viáveis e a taxa de sobrevivência das bifidobactérias diminuiu ($P < 0,05$). Este comportamento pode ser atribuído ao baixo valor do pH nesta etapa, uma vez que uma solução de pepsina foi adicionada e o pH foi diminuído gradualmente até atingir o pH 2 para simular o suco gástrico como ocorre naturalmente no estômago humano. Mesmo com essa diminuição a contagem de células viáveis de bifidobactérias foram mantidas acima do recomendado para um produto ser considerado probiótico ($> 6 \log \text{ UFC g}^{-1}$). O mesmo comportamento foi observado por Madureira et al. (2005) para queijo de soro de leite português com *Bifidobacterium* BB-12, *B. animalis* e *L. brevis* Bo LMG 6906; por Madureira et al. (2011) para queijo de soro de leite com *B. animalis* Bo e por Bedani et al. (2014) para iogurte de soja com *Bifidobacterium* BB-12. De acordo com Madureira et al. (2005), as condições do estômago são muito prejudiciais para alguns gêneros de bactérias que podem não suportar esse ambiente extremo, reduzindo assim o seu número de células viáveis. Além disso, Matsumoto, Ohishi e Benno (2004) afirmam que a tolerância ácida de bactérias lácticas depende de fatores como o meio de crescimento, condições de incubação, do perfil do pH das enzimas H^+ -ATPase e da composição da membrana citoplasmática de cada gênero.

Após a exposição às condições gastrointestinais simuladas do esôfago-estômago, as amostras foram submetidas às condições

gastrointestinais simuladas do duodeno, ou seja, aos sais biliares, pancreatina e pH 5,0. Nesta etapa a contagem de células viáveis e a taxa de sobrevivência das bifidobactérias da amostra C3 aumentaram ($P < 0,05$), mas estes parâmetros não foram afetados ($P > 0,05$) na amostra B3. No entanto, como verificado por Madureira et al. (2011), o aumento observado na amostra C3 não pode ser atribuído à multiplicação celular, mas sim a recuperação de células injuriadas. Além disso, foi possível verificar o efeito positivo da matriz estruturada da amostra C3 (queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala) que aparece como um protetor das células bacterianas à ação dos sais biliares. Apesar da natureza antimicrobiana dos sais biliares, principalmente sua capacidade de dissolver membranas bacterianas e de sua natureza anfifílica relatada por Madureira et al. (2011), as bifidobactérias podem não ter sido muito expostas a eles por causa da presença da matriz do queijo. Além disso, Begley, Gahan e Hill (2005) afirmaram que alguns componentes do alimento podem ligar-se aos sais biliares, o que protegeria as bactérias probióticas da sua toxicidade. De acordo com Calvo et al. (2007), Ong, Henriksson e Shah (2006) e Phillips, Kailasapathy e Tran (2006) o teor de lipídeos presentes no queijo de búfala também poderia oferecer mais proteção as bactérias probióticas durante a sua passagem através do trato gastrointestinal. Além disso, o aumento do pH para 5,0 poderia ser uma condição favorável para a sobrevivência das bifidobactérias, como observado por Boylston et al. (2004).

Nas condições gastrointestinais simuladas do duodeno, as células de bifidobactérias presentes no caldo MRS (amostra B3) aparentemente atingiram esta etapa em estado mais frágil do que as células presentes no queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala (amostra C3). Desta maneira, a recuperação de células da amostra B3 não foi completamente possível devido aos vários danos causados pela anterior exposição às condições gastrointestinais simuladas da boca e do esôfago-estômago.

Foi verificada uma diminuição ($P < 0,05$) na contagem de células viáveis de bifidobactérias e na taxa de sobrevivência na amostra C3, após esta ser submetida às condições gastrointestinais simuladas do íleo. No entanto não foi observada variação significativa quando comparada com as contagens de células viáveis iniciais, ou seja, antes da exposição às condições gastrointestinais simuladas. Já para a amostra B3 os valores foram mantidos inalterados ($P > 0,05$). De acordo com Madureira et al. (2011) este comportamento pode ser explicado por causa do pH próximo da neutralidade (aproximadamente 6,5) predominante nesta etapa. Ruass-Madiedo, Hugenholtz e Zoon (2002)

verificaram que um queijo usado como carreador também apresentou efeito protetor sobre a contagem de células viáveis de bifidobactérias.

Por fim, estes resultados são relevantes uma vez que a contagem de células viáveis probióticas deve chegar em número suficientemente elevado nesta fase da digestão, para então aderir à parede do intestino e iniciar as suas atividades biológicas, exercendo assim os efeitos benéficos a saúde. Com base nestes resultados, também foi possível notar a importância do desenvolvimento de um queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala como uma matriz apropriada para carrear bactérias probióticas.

4 Conclusões

Foi observado o efeito protetor do queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala sobre as células de *Bifidobacterium* BB-12 nas condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, incluindo a recuperação das células injuriadas após a passagem pela etapa do duodeno. No queijo tipo Minas Frescal do leite de búfala as bifidobactérias mantiveram a contagem de células viáveis acima do recomendado para um produto probiótico após todas as etapas das condições gastrointestinais simuladas. Por fim, o queijo tipo Minas Frescal mostrou um grande potencial como produto lácteo com alegação funcional, uma vez que a presença de uma matriz estruturada parece influenciar favoravelmente a sobrevivência das bactérias probióticas durante a passagem pelo sistema gastrointestinal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Cryovac® por fornecer as embalagens para as amostras de queijo, assim como agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Referências

ABADÍA-GARCÍA, L.; CARDADOR, A.; DEL CAMPO, S. T. M.; ARVÍZU, S. M.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-

GONZÁLEZ, C.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.; AMAYA-LLANO, S. L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 191-197, 2013.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366-376, 2011.

BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-443, 2014.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375-387, 2004.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 173-180, 2005a.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005b.

CALVO, M. V.; CASTILLO, I.; DÍAZ-BARCOS, V.; REQUENA, T.; FONTECHA, J. Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain

starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. **Food Chemistry**, v. 102, p. 917-924, 2007.

CHOI, S. Y.; CHUNG, M. J.; LEE, S. J.; SHIN, J. H.; SUNG, N. J. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control**, v. 18, p. 485-491, 2007.

CUNHA, C. R.; VIOTTO, W. H.; VIOTTO, L. A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 215-224, 2006.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. ***In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin a carotenoids in foods.** HarvestPlus Technical Monograph 3; International Food Policy Research Institute and International Center of Tropical Agriculture: Washington, DC. 2005.

FAO/WHO. **Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation.** Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. FAO Food and Nutritional Paper No. 85. (ISBN 92-5-105513-0), 2006.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621-627, 2010.

GOMES, A. M. P.; VIEIRA, M. M.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 281-301, 1998.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X. M.; ZHANG H. P. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei*

Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1640-1646, 2009.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, p. 162-169, 2001.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 2: Curd yield, overall quality and casein fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1404-1410, 2012.

LAURENT, C.; BESANCON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1704–1712, 2007.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. L.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Food**, v. 15, p. 921-927, 2005.

MAKELAINEN, H.; FORSSTEN, S.; OLLI, K.; GRANLUND, L.; RAUTONEN, N.; OUWEHAND, A. C. Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 675–683, 2009.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 109-113, 2004.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 13-126, 1999.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446-456, 2006.

ORTAKCI, F.; BROADBENT, J. R.; MCMANUS, W. R.; MCMAHON, D. J. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6274-6281, 2012.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 276-280, 2006.

RUASS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.

SALMINEN, S.; KENIFEL, W.; OUWEHAND, A. C. Probiotics, applications in dairy products. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 503-511.

SCHELLER, M.; O'SULLIVAN, D. J. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies lactis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1122-1131, 2011.

SHAH, N. P. *Bifidobacterium spp.*: Applications in Fermented Milks. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, San Diego, California, 2011. pp. 685-697.

SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G.; LEMMETTI, F.; GIUDICI, P. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, p. 240-249, 2014.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 633-640, 2009.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos, pôde-se observar que ao final do tempo de armazenamento a amostra contendo as bifidobactérias foi classificada como probiótica.

Após 30 dias de armazenamento, as amostras de queijo mostraram um aumento nos valores de sinerese, enquanto que os outros parâmetros físicos permaneceram inalterados. O queijo mostrou uma tendência à cor branca.

O modelo de Maxwell generalizado ajustou-se melhor aos dados experimentais do que os modelos de Maxwell e de Peleg. A adição de bifidobactérias e o tempo de armazenamento dos queijos tipo Minas Frescal de leite de búfala não afetaram as suas propriedades reológicas. Estas propriedades indicaram uma tendência a obtenção de queijos rígidos e elásticos, mostrando tendência a ser mais elástico do que viscoso. Além da importância tecnológica, estes parâmetros estão relacionados com a parte econômica e comercial desse produto, isso porque os efeitos do transporte, da manipulação e da estocagem poderiam comprometer a sua integridade física. Assim, os resultados encontrados nesse trabalho indicam características comerciais vantajosas, como a não alteração física da matriz durante o tempo de validade e devido a sua dureza esses queijos apresentam capacidade de empilhamento sem sofrer deformação.

O efeito protetor do queijo de leite de búfala sobre as bifidobactérias foi observado durante as condições gastrointestinais simuladas, inclusive quanto à recuperação das células injuriadas após a etapa do duodeno.

O queijo tipo Minas Frescal de leite de búfala apresentou-se como um protetor para *Bifidobacterium* BB-12 durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, tornando-se um carreador promissor para esta bactéria probiótica. Além disso, o desenvolvimento de um produto que apresenta alegação funcional poderia impulsionar a produção e consumo de derivados do leite de búfala, bem como aumentar a disponibilidade de alimentos probióticos ao consumidor.

Anexos

Anexo A – Artigo “**Rheological behavior and protective effect of buffalo Minas Frescal cheese matrix on probiotic strain as a function of storage time**” submetido à “**Journal of Food Engineering**”

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Food Engineering
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Properties and modeling texture of buffalo Minas Frescal cheese added with Bifidobacterium Bb-12 as a function of storage time

Article Type: Research Article

Keywords: buffalo Minas Frescal cheese; bifidobacteria; rheology; viscoelasticity; texture modeling; stress relaxation.

Corresponding Author: Dr. Elane S Prudêncio, Dr

Corresponding Author's Institution: Federal University of Santa Catarina

First Author: Silvani Verruck, MSc

Order of Authors: Silvani Verruck, MSc; Elane S Prudêncio, Dr; Carmen O Moller, PhD; Carlise B Fritzen-Freire, PhD; Renata C Amboni, PhD

Abstract: Buffalo Minas Frescal cheeses produced with and without a probiotic culture were evaluated in relation to the viability of Bifidobacterium Bb-12, physicochemical, color, rheological and microstructural properties during 30 days of storage. The cheese formulation containing bifidobacteria was classified as probiotic. After 30 days of storage, the cheese samples showed an increase in the syneresis values, while the other physicochemical parameters remained unaltered. Both cheese samples showed a tendency to white color. The generalized Maxwell model fits the experimental data better than the Maxwell and the Peleg models. As request, the addition of bifidobacteria and the storage time of the buffalo Minas Frescal cheeses did not affect its rheological properties. These properties indicated a tendency to obtain stiff and elastic cheeses, showing a tendency to be more elastic than viscous.

Anexo B – Trabalhos apresentados em eventos



Se deja constancia que el trabajo científico titulado

**ANALISE INSTRUMENTAL DO PERFIL DE TEXTURA DE QUEIJO MINAS
FRESAL DE LEITE DE BUFALA ADICIONADO DE BIFIDOBACTERIA**

de los autores

Silvani VERRUCK, Carlise B. FRITZEN-FREIRE, Elaine S. PRUDÊNCIO, Carmen M. O.
MÜLLER, Renata D. M. C. AMBONI*

ha sido presentado en la modalidad póster en la 6ta edición del Simposio Internacional de
Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2013, desarrollado los días 7, 8 y 9 de
octubre de 2013 en la sede del LATU, en Montevideo, Uruguay.

M.Sc. Rosa Márquez Romero
por Comité Científico INNOVA 2013



Se deja constancia que el trabajo científico titulado

**AVALIAÇÃO DA COR DE QUEIJO MINAS FRESCAL DE LEITE DE
BUFALA (Bubalus bubalis) ADICIONADO DE Bifidobacterium BB-12,
DURANTE O SEU ARMAZENAMENTO**

de los autores

*Silvani VERRUCK; Carlise B. FRITZEN-FREIRE; Gabriela R. LIZ; Renata D. M. C. AMBONI;
Elane S. PRUDÊNCIO*

ha sido presentado en la modalidad póster en la 6ta edición del Simposio Internacional de
Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2013, desarrollado los días 7, 8 y 9 de
octubre de 2013 en la sede del LATU, en Montevideo, Uruguay.

M.Sc. Rosa Márquez Romero
por Comité Científico INNOVA 2013